



# Restauration d'images 3D de microscopie de fluorescence en présence d'aberrations optiques

Saïma Ben Hadj

## ► To cite this version:

Saïma Ben Hadj. Restauration d'images 3D de microscopie de fluorescence en présence d'aberrations optiques. Autre. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4015 . tel-00847334

**HAL Id: tel-00847334**

**<https://theses.hal.science/tel-00847334>**

Submitted on 23 Jul 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE NICE - SOPHIA ANTIPOLIS  
**ÉCOLE DOCTORALE STIC**  
SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'INFORMATION  
ET DE LA COMMUNICATION

# THÈSE

pour obtenir le titre de

**Docteur en Sciences**

de l'Université de Nice - Sophia Antipolis

**Mention : AUTOMATIQUE, TRAITEMENT DU SIGNAL ET DES  
IMAGES**

Présentée et soutenue par

**Saima BEN HADJ**

## **Restauration d'images 3D de microscopie de fluorescence en présence d'aberrations optiques**

Thèse dirigée par Laure BLANC-FÉRAUD

préparée à l'I3S/INRIA/IBV, Projet MORPHÈME

soutenue le 17 avril 2013

### **Jury :**

<i>Rapporteurs :</i>	Christine DE MOL	- Université Libre de Bruxelles
	Jean-François GIOVANNELLI	- IMS (Groupe Signal et Image)
<i>Directrice :</i>	Laure BLANC-FÉRAUD	- I3S (Morphème)
<i>Examineurs :</i>	Josiane ZERUBIA	- INRIA (Ayin)
	Gilles AUBERT	- UNSA/CNRS
	Jean-Christophe OLIVO-MARIN	- Institut Pasteur
	Loïc DENIS	- TELECOM Saint-Étienne



---

## Restauration d'image biologique 3D

**Résumé :** Dans cette thèse, nous nous intéressons à la restauration d'image tridimensionnelle de microscopie de fluorescence. Deux difficultés majeures dans ce système d'imagerie sont traitées. La première est le flou variable en profondeur qui est dû aux aberrations induites par la variation des indices de réfraction dans le système optique et le spécimen imagé. La deuxième est le bruit qui est principalement dû au processus de comptage de photons. L'objectif de cette thèse est de réduire ces distorsions afin de fournir aux biologistes une image de meilleure qualité possible.

Dans la première partie de cette thèse, nous étudions les modèles d'approximation du flou variable en profondeur et nous choisissons un modèle adéquat au problème d'inversion. Dans ce modèle, la réponse impulsienne (RI) variable en profondeur est approchée par une combinaison convexe d'un ensemble de RIs invariables spatialement. Nous développons pour ce modèle deux méthodes rapides de restauration non-aveugle par minimisation d'un critère régularisé, chacune d'elles est adaptée au type de bruit présent dans les images de microscopie confocale ou à champ large.

Dans la deuxième partie, nous abordons le problème de restauration aveugle et proposons deux méthodes dans lesquelles le flou variable en profondeur et l'image sont conjointement estimés. Dans la première méthode, la RI est estimée en chaque voxel du volume considéré afin de laisser une grande liberté sur la forme de la RI, tandis que dans la deuxième méthode, la forme de la RI est contrainte par une fonction gaussienne afin de réduire le nombre de variables inconnues et l'espace des solutions possibles. Dans ces deux méthodes d'estimation aveugle, l'effet des aberrations optiques n'est pas efficacement estimée en raison du manque d'information. Nous améliorons ces méthodes d'estimation en alternant des contraintes dans les domaines fréquentiel et spatial. Des résultats sont montrés en simulation et sur des données réelles.

**Mots clés :** Flou variable spatialement, microscopie de fluorescence, régularisation, restauration, PSF.

---

---

### 3D biological image restoration

**Abstract :** In this thesis, we focus on the restoration of three-dimensional image of fluorescence microscopy. Two major difficulties in this imaging system are considered. The first one is the depth-variant blur due to aberrations induced by the refractive index variation in the optical system and the imaged specimen. The second difficulty is the noise due to the photon counting process. The goal of this thesis is to reduce these distortions in order to provide biologists with a better image quality.

In the first part of this thesis, we study the approximation models of the depth-variant blur and choose an appropriate model for the inversion problem. In that model, the depth-variant point spread function (PSF) is approximated by a convex combination of a set of space-invariant PSFs. We then develop for that model two fast non-blind restoration methods by minimizing a regularized criterion, each of these methods is adapted to the type of noise present in images of confocal or wide field microscopy.

In the second part, we address the problem of blind restoration and propose two methods where the depth-variant blur and the image are jointly estimated. In the first method, the PSF is estimated at each voxel in the considered volume in order to allow high degree of freedom on the PSF shape while in the second method, the shape of the PSF is constrained by a Gaussian function in order to reduce the number of unknown variables and the space of possible solutions. In both blind estimation methods, the effect of optical aberrations is not effectively estimated due to the lack of information. We thus improve these estimation methods by alternating some constraints in the frequency and spatial domains. Results on simulated and real data are shown.

**Keywords :** Fluorescence microscopy, PSF, regularization, restoration, space-variant blur.

---



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Microscopie de fluorescence 3D</b>	<b>5</b>
1.1	Présentation du système . . . . .	6
1.1.1	Phénomène de fluorescence . . . . .	6
1.1.2	Microscopie de fluorescence conventionnelle . . . . .	7
1.1.3	Microscopie de fluorescence confocale . . . . .	8
1.2	Les principales distorsions . . . . .	8
1.2.1	Flou . . . . .	10
1.2.1.1	Diffraction . . . . .	10
1.2.1.1.a	Limite de résolution . . . . .	11
1.2.1.2	Défocalisation . . . . .	13
1.2.1.3	Aberration . . . . .	14
1.2.1.3.a	Aberrations chromatiques . . . . .	14
1.2.1.3.b	Aberrations géométriques . . . . .	14
1.2.1.3.c	Effets des aberrations sphériques . . . . .	15
1.2.2	Bruit . . . . .	17
1.2.2.1	Bruit de photon . . . . .	17
1.2.2.2	Bruit de détecteur . . . . .	17
1.2.2.3	Bruit de fond . . . . .	17
1.3	Formulation mathématique . . . . .	18
1.3.1	Notations mathématiques . . . . .	18
1.3.2	Modèle de flou . . . . .	19
1.3.2.1	Notations discrètes . . . . .	20
1.3.3	Modèle de bruit . . . . .	21
1.4	Modélisation de la PSF . . . . .	22
1.4.1	Modèle de Stokseth . . . . .	23
1.4.1.1	Expression de la PSF cohérente . . . . .	24
1.4.1.2	Phase de défocalisation . . . . .	26
1.4.1.3	Phase d'aberrations . . . . .	26
1.4.2	Étude des PSFs avec aberrations . . . . .	27
1.4.3	Approximation gaussienne de la PSF . . . . .	31
1.4.3.1	Approximation gaussienne en absence d'aberrations . . . . .	32
1.4.3.2	Approximation gaussienne en présence d'aberrations . . . . .	35
1.5	Amélioration de la résolution : solutions matérielles . . . . .	36
<b>2</b>	<b>Restauration non-aveugle</b>	<b>41</b>
2.1	Problématique . . . . .	42
2.2	État de l'art sur les méthodes de déconvolution : flou SI . . . . .	43
2.2.1	Méthodes déterministes . . . . .	43
2.2.1.1	Méthodes directes en une seule passe . . . . .	43

2.2.1.1.a	Méthodes directes non-régularisées . . . . .	44
2.2.1.1.b	Méthodes directes non-régularisées . . . . .	44
2.2.1.2	Méthodes itératives . . . . .	45
2.2.1.2.a	Méthodes itératives basiques . . . . .	46
2.2.1.2.b	Méthodes avec contraintes . . . . .	47
2.2.1.2.c	Méthodes régularisées . . . . .	48
2.2.2	Méthodes stochastiques . . . . .	51
2.2.3	Sélection du paramètre de régularisation . . . . .	52
2.2.3.1	Cadre déterministe . . . . .	52
2.2.3.2	Cadre stochastique . . . . .	53
2.3	État de l'art sur les méthodes de restauration : flou SV . . . . .	53
2.4	Modèle de flou SV . . . . .	54
2.4.1	Première classe de modèles d'approximation du flou SV . . . . .	55
2.4.2	Deuxième classe de modèles d'approximation du flou SV . . . . .	55
2.4.3	Propriétés du modèle choisi . . . . .	55
2.4.3.1	Normalisation de la PSF SV . . . . .	58
2.4.3.2	Conservation de flux pour le modèle SV . . . . .	59
2.4.4	Comparaison des modèles . . . . .	60
2.4.5	Forme, position et nombre de fonctions de pondération . . . . .	61
2.5	Restauration avec un opérateur de flou SV . . . . .	65
2.5.1	Restauration en présence de bruit de Poisson . . . . .	67
2.5.1.1	Algorithme SGP . . . . .	67
2.5.1.2	Algorithme SGP pour la restauration SV . . . . .	70
2.5.1.3	Tests et comparaison . . . . .	71
2.5.1.3.a	Test sur une image simulée de CLSM : . . . . .	72
2.5.1.3.b	Test sur une image réelle de CLSM . . . . .	75
2.5.2	Restauration en présence de bruit gaussien . . . . .	75
2.5.2.1	Algorithme de Fornasier et al. pour la restauration SV . . . . .	76
2.5.2.2	Convergence pour la fonctionnelle (2.64) . . . . .	79
2.5.2.3	Tests et comparaison . . . . .	81
2.5.2.3.a	Test sur une image simulée microscopie à champ large . . . . .	81
2.5.2.3.b	Test sur une image réelle . . . . .	82
2.6	Comparaison sur la restauration SV . . . . .	84
2.6.1	Comparaison dans le cas d'une statistique de bruit poissonnienne . . . . .	84
2.6.2	Comparaison dans le cas d'une statistique de bruit gaussienne . . . . .	85
<b>3</b>	<b>Restauration aveugle</b> . . . . .	<b>87</b>
3.1	Problématique . . . . .	88
3.2	État de l'art . . . . .	89
3.2.1	Déconvolution aveugle : flou SI . . . . .	89
3.2.1.1	Méthodes d'identification a priori de la fonction de flou . . . . .	89
3.2.1.1.a	Estimation à partir des zéros fréquentiels . . . . .	90



3.2.1.1.b	Estimation par marginalisation des variables cachées . . . . .	90
3.2.1.2	Méthodes d'estimation jointe de la fonction de flou et de l'image . . . . .	90
3.2.1.2.a	Méthodes déterministes . . . . .	90
3.2.1.2.b	Méthodes stochastiques . . . . .	92
3.2.2	Restauration aveugle : flou SV . . . . .	93
3.2.2.1	Méthodes d'identification a priori du flou SV . . . . .	93
3.2.2.2	Méthodes d'estimation jointe du flou SV et de l'image . . . . .	94
3.3	Première méthode proposée : PSF non-paramétrée . . . . .	95
3.3.1	Notations . . . . .	96
3.3.2	Critère MAPJ . . . . .	96
3.3.3	Existence d'une solution . . . . .	97
3.3.4	Résolution numérique . . . . .	103
3.3.4.1	Problème discret . . . . .	103
3.3.4.2	Schéma de minimisations alternées . . . . .	104
3.3.4.3	Algorithme SGP pour l'estimation de la PSF . . . . .	106
3.3.5	Tests expérimentaux . . . . .	107
3.3.5.1	Choix des paramètres de régularisation . . . . .	107
3.3.5.2	Tests sur des images simulées . . . . .	108
3.3.5.3	Tests sur des images réelles . . . . .	110
3.3.5.4	Discussion des résultats . . . . .	113
3.4	Seconde méthode proposée : PSF paramétrée . . . . .	115
3.4.1	Régularisation de la PSF . . . . .	116
3.4.2	Critère MAPJ et résolution numérique . . . . .	120
3.4.3	Tests expérimentaux . . . . .	121
3.4.3.1	Tests sur des images simulées . . . . .	122
3.4.3.2	Tests sur des images réelles . . . . .	122
3.4.4	Discussions et comparaisons . . . . .	122
3.5	Restauration aveugle avec contrainte de support sur l'objet . . . . .	128
3.5.1	Estimation non-paramétrique avec contrainte de support sur l'objet . . . . .	128
3.5.1.1	Tests numériques . . . . .	129
3.5.2	Estimation paramétrique avec contrainte de support sur l'objet . . . . .	132
3.5.2.1	Tests numériques . . . . .	133
<b>4</b>	<b>Conclusion générale et perspectives</b> . . . . .	<b>135</b>
4.1	Résumé . . . . .	135
4.2	Perspectives . . . . .	136
4.2.1	Restauration aveugle par extraction de la phase . . . . .	136
4.2.1.1	Contrainte de phase sur la PSF . . . . .	136
4.2.1.2	Algorithme d'estimation avec contrainte de phase sur la PSF . . . . .	137
4.2.1.3	Tests numériques . . . . .	138
4.2.2	Estimation des hyperparamètres . . . . .	139

4.2.3	Estimation de la position de l'objet et utilisation de la tomographie diffractive . . . . .	140
4.2.4	Algorithmes rapides d'optimisation . . . . .	140
4.2.5	Extension à d'autres applications . . . . .	140
<b>A</b>	<b>Calcul du gradient</b>	<b>143</b>
<b>B</b>	<b>Mesures de qualité</b>	<b>145</b>
B.1	Mesures de qualité avec référence . . . . .	145
B.1.1	Erreur quadratique moyenne (MSE) . . . . .	145
B.1.2	Erreur quadratique moyenne normalisée (NMSE) . . . . .	146
B.1.3	Rapport signal sur bruit (SNR) . . . . .	146
B.1.4	Rapport signal sur bruit maximal (PSNR) . . . . .	146
B.1.5	Indice de similarité structurelle (SSIM) . . . . .	146
B.2	Mesures de qualité sans référence . . . . .	147
B.2.1	Sensibilité de Q au flou 3D . . . . .	148
B.2.2	Sensibilité de la mesure Q au flou 3D variable en profondeur . . . .	149
B.2.3	Sensibilité de la mesure Q au bruit de Poisson . . . . .	149
B.2.4	Sensibilité de la mesure Q au flou SV et au bruit de Poisson conjointement . . . . .	149
<b>C</b>	<b>Système de tomographie diffractive</b>	<b>151</b>
C.1	Reconstruction d'image . . . . .	151
C.1.1	Enregistrement de l'onde diffractée : . . . . .	151
C.1.2	Reconstruction numérique de l'objet . . . . .	152
C.2	Limites de l'imagerie TDM . . . . .	154
	<b>Bibliographie</b>	<b>157</b>

# Table des figures

1.1	Diagramme de Jablonski des états énergétiques de la fluorescence : En absorbant un photon, la molécule passe d'un état d'équilibre $S_0$ à un niveau d'énergie supérieur $S_2$ . Pendant cet état d'excitation, la molécule perd une partie de son énergie par dissipation et atteint le niveau d'énergie $S_1$ . Pour retrouver son état fondamental $S_0$ , la molécule émet un photon avec une énergie $E_{em}$ , qui est inférieure à celle absorbée $E_{ex}$ . . . . .	6
1.2	Déplacement de Stokes : Le spectre d'émission (la courbe en rouge) est toujours décalé par rapport au spectre d'excitation (la courbe en bleu) dans la direction des longueurs d'onde $\lambda$ supérieures. . . . .	7
1.3	Présentation des principales techniques de microscopie de fluorescence. (a) La microscopie à champ large, (b) la microscopie confocale : le sténopé filtre la lumière provenant des plans hors-focalisation. . . . .	9
1.4	Coupes d'une image 3D de cellules de muguet ( <i>convallaria majalis</i> ) prise avec un microscope confocal de type LSM 780 ©INRA. Les paramètres d'acquisition de cette image sont les suivants : objectif à immersion avec une ouverture numérique de 1.4, les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation sont respectivement centrés à 560nm et 600nm. Les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement 50nm et 150nm, pour respecter l'échantillonnage de Nyquist. . . . .	9
1.5	L'ouverture numérique $NA = n_i \sin(\theta_{max})$ détermine l'angle maximale $\theta_{max}$ que fait le rayon le plus écarté possible qui peut rentrer dans l'objectif, avec l'axe optique ( $OZ$ ). . . . .	10
1.6	Image de diffraction : (a) image de la tâche d'Airy en 2D, (b) représentation en 3D, la troisième dimension étant l'intensité. . . . .	11
1.7	La résolution est la capacité à séparer deux points discernables vus à travers le microscope. La première ligne montre l'image de deux points vus à travers un système limité par la diffraction, la deuxième ligne montre une ligne d'intensité de l'image 2D, prise suivant l'axe ( $OX$ ). ((a) et (d)) correspondent à deux points résolus, ((b) et (e)) correspondent à deux points qui touchent la limite de résolution et ((c) et (f)) correspondent à deux points non-résolus. . . . .	12
1.8	Profondeur de champ : ensemble de points suivant l'axe ( $OZ$ ) qui sont simultanément focalisés. . . . .	13
1.9	Les lentilles composant l'objectif font concentrer la lumière provenant d'un point source situé dans le plan focal (en rouge) en un point unique dans le plan confocal. Cependant, l'émission de la lumière en dehors du plan de focalisation (en bleu) aboutit à un flou dans le plan de détection (plan confocal des lentilles). . . . .	14

1.10	L'image d'une onde plane par un système optique idéal (sans aberrations sphériques) est une onde sphérique (a). En présence d'aberrations, la surface d'onde est déformée (b). . . . .	16
1.11	Différence de marches des rayons lumineux à travers les différentes couches du système (le milieu d'immersion et la lamelle sont supposés de même IR, le spécimen a un IR différent). Le rayon en rouge, correspondant à un cas idéal sans aberrations sphériques, se focalise à une position nominale (NFP). Le rayon en bleu, correspondant aux conditions réelles, en présence d'aberrations sphériques, se focalise à une position réelle (AFP). .	16
1.12	Chaîne de dégradation d'image en microscopie de fluorescence. . . . .	18
1.13	Influence de la variation d'IR sur la PSF : Coupes ( $X, Z$ ) (présentée dans la première colonne à gauche) et ( $X, Y$ ) (présentées dans les autres colonnes) de deux PSFs calculées respectivement à des profondeurs de $0\mu m$ (a) et $10\mu m$ (b). Les images sont présentées à une échelle logarithmique. . . . .	28
1.14	Profils d'intensité suivant l'axe ( $OZ$ ) des PSFs calculées à différentes profondeurs : $0nm$ , $5nm$ , $15nm$ , $25nm$ et $60nm$ pour deux systèmes ayant respectivement une ouverture numérique de (a) $NA = 1,4$ et (b) $NA = 0,6$ . . . . .	29
1.15	Variation du décalage de focalisation axiale (en $\mu m$ ) en fonction de la profondeur nominale NFP (en $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e. l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont tracées pour un système non-paraxial (a) et un système paraxial (b). . . . .	29
1.16	Variation de l'intensité maximale de la PSF en fonction de la profondeur nominale NFP (en $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e. l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont tracées pour un système non-paraxial (a) et un système paraxial (b). . . . .	30
1.17	Variation de l'erreur quadratique entre la PSF immédiatement au dessous de la lamelle $h_0$ (à une profondeur nulle) et la PSF $h_{NFP}$ à une profondeur donnée entre $0\mu m$ et $60\mu m$ en fonction de la profondeur nominale NFP (en $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e. l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont montrées pour un système non-paraxial (a) et un système paraxial (b). . . . .	31
1.18	Variation de l'erreur quadratique entre la PSF à une profondeur nulle $h_0$ et la PSF à une profondeur donnée $h_{NFP}$ recentrée, en fonction de la profondeur nominale NFP (en $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e. l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont montrées pour un système non-paraxial. . . . .	32

1.19	Approximation gaussienne de la PSF d'un système non-paraxial sans aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 1,4 : la première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes $(X, Y)$ et $(X, Z)$ , en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 3.5%. . . . .	34
1.20	Approximation gaussienne de la PSF d'un système paraxial sans aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 0,6 : la première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes $(X, Y)$ et $(X, Z)$ , en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 0.8%. . . . .	34
1.21	Approximation gaussienne de la PSF d'un système sans aberrations sphériques dans les deux cas paraxial et non-paraxial : profils d'intensité suivant l'axe $(OX)$ (gauche) et suivant l'axe $(OZ)$ (droite) de la PSF théorique (en rouge) et de la PSF gaussienne (en vers) pour un système non-paraxial sans aberration sphérique (première ligne (a) et (b)) et pour un système paraxial sans aberration sphérique (deuxième ligne (c) et (d)). . . . .	35
1.22	Approximation gaussienne de la PSF d'un système non-paraxial avec aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 1,4 : la première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes $(X, Y)$ et $(X, Z)$ , en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 8.74%, les paramètres de la PSF gaussienne estimée sont $\hat{\sigma}_r = 95$ , $\hat{\sigma}_z = 640$ , $\hat{\mu}_z = -1650$ . . . . .	36
1.23	Approximation gaussienne de la PSF d'un système paraxial avec aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 0,6 : La première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes $(X, Y)$ et $(X, Z)$ , en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 0.35%, les paramètres de la PSF gaussienne estimée sont $\hat{\sigma}_r = 148$ , $\hat{\sigma}_z = 1210$ , $\hat{\mu}_z = -450$ . . . . .	37
1.24	Approximation gaussienne de la PSF d'un système avec aberrations sphériques, les cas paraxial et non-paraxial sont considérés : profils d'intensité suivant l'axe $(OX)$ (gauche) et suivant l'axe $(OZ)$ (droite) de la PSF théorique (en rouge) et de la PSF gaussienne (en vers) pour un système non-paraxial avec aberration sphérique (première ligne (a) et (b)) et pour un système paraxial avec aberration sphérique (deuxième ligne (c) et (d)). . . . .	38
2.1	Approximation de la PSF à une profondeur de $6\mu m$ : Coupes $(X, Z)$ de (a) la PSF théorique, (b) la PSF approchée par le modèle (2.33), (c) l'erreur entre la PSF du modèle (2.33) et la PSF théorique, (d) la PSF approchée par le modèle (2.35), (e) l'erreur entre la PSF du modèle (2.35) et la PSF théorique. . . . .	61

2.2	Coupes $(X,Z)$ de (a) l'image originale, (b) image floutée en utilisant le modèle (2.32), (d) image floutée par le modèle théorique de référence, (e) image floutée en utilisant le modèle (2.34), (c) et (f) présentent respectivement les erreurs absolues entre les images floutées par les modèles (2.32) et (2.34) et l'image de référence (d). . . . .	62
2.3	Différentes fonctions de pondération utilisées pour calculer l'erreur d'approximation : (a) fonctions linéaires (Spline d'ordre 1), (b) fonctions quadratiques (Spline d'ordre 2) , (c) fonctions cubiques (Spline d'ordre 3), (d) fonctions optimales obtenues en minimisant l'erreur quadratique entre la PSF théorique et la PSF du modèle d'approximation. . . . .	65
2.4	Position des PSFs calculées par la technique proposée pour différentes variations d'IRs : l'IR du milieu d'immersion étant fixé à $n_i = 1.515$ , nous avons fait varier l'IR $n_s$ du spécimen entre 1.33 et 1.51. Les points en rouge correspondent à $n_s = 1.33$ , les points en vert correspondent à $n_s = 1.36$ , les points en bleu correspondent à $n_s = 1.39$ , les points en jaune correspondent à $n_s = 1.42$ , les points en rose correspondent à $n_s = 1.45$ , les points en bleu ciel correspondent à $n_s = 1.48$ , et le point en noir correspond à une seule PSF pour $n_s = 1.515$ . . . . .	66
2.5	Profils d'intensité passant par les centres des billes le long de l'axe $(OZ)$ de l'image originale (bleu), de l'image dégradée (rouge), de la restauration avec une PSF SI (bleu ciel), et de la restauration avec l'opérateur $\tilde{H}$ (rose). . . . .	73
2.6	Profils d'intensité passant par les centres des billes le long de l'axe $(OZ)$ de l'image originale (bleu), de l'image dégradée (rouge), de la restauration avec la méthode RLTV adaptée à un opérateur de flou SV $\tilde{H}$ (bleu ciel), et de la restauration avec la méthode proposée utilisant l'algorithme SGP adaptée à l'opérateur $\tilde{H}$ (rose). . . . .	74
2.7	Restauration d'une image simulée de CLSM avec un bruit de Poisson : Coupes $(X,Z)$ de l'objet originale (a) de l'observation (b), de la restauration avec la méthode proposée utilisant l'algorithme SGP adaptée à l'opérateur $\tilde{H}$ (c), de la restauration avec une PSF SI (d), de la restauration avec l'algorithme RLTV adaptée à l'opérateur $\tilde{H}$ (e), de la restauration avec la méthode EMMA (f). . . . .	74
2.8	Restauration d'une image réelle de CLSM : projections du maximum d'intensité sur le plan $(X,Z)$ de l'observation (a), de la restauration avec l'opérateur $\tilde{H}$ (b), de la restauration avec la méthode EMMA (c), de la restauration avec une PSF invariable (d). . . . .	75
2.9	(a) Décomposition du domaine de l'image en deux sous-domaines recouvrant, (b) exemple de variation des fonctions de $\chi_1$ et $\chi_2$ suivant la direction de décomposition, suivant l'axe $(OZ)$ dans nos tests. . . . .	77

2.10	Restauration d'une image simulée de microscopie à champ large (avec un bruit gaussien) : Coupes $(X, Z)$ de l'objet originale (a) de l'observation (b), de la restauration avec la méthode proposée utilisant l'algorithme de Fornasier adaptée à l'opérateur $\tilde{H}$ (c), de la restauration avec une PSF SI (d), de la restauration avec l'algorithme de Landweber adaptée à l'opérateur $\tilde{H}$ (e), de la restauration avec la méthode EMMA (f). . . . .	82
2.11	Profils d'intensité passant par les centres des billes le long de l'axe $(OZ)$ de l'image originale (bleu), de l'image dégradée (vert), de la restauration avec la méthode EMMA (bleu ciel), et de la restauration avec l'opérateur $\tilde{H}$ (rouge) et de la restauration avec une PSF SI (noir). . . . .	83
2.12	Les projections du maximum d'intensité sur les plans $(X, Y)$ et $(X, Z)$ de ((a) et (e)) l'image observée, ((b) et (f)) l'image restaurée par la méthode proposée, ((c) et (g)) image restaurée par la méthode EMMA, et ((d) et (h)) l'image restaurée par une PSF SI prise au milieu de l'échantillon. . . . .	83
2.13	(a) Principe de la restauration SV en utilisant la méthode EMMA. $R_i, i = 1, \dots, M$ désigne la restauration avec une PSF SI $h_i$ , (b) Principe de la restauration SV proposée : approcher l'opérateur de flou SV $\tilde{H}$ et l'utiliser dans la procédure de restauration. . . . .	84
2.14	Profils d'intensité passant par les centres des billes le long de l'axe $(OZ)$ de l'image originale (bleu), de l'image dégradée (rouge), de la restauration avec la méthode EMMA (bleu ciel), et de la restauration avec l'opérateur $\tilde{H}$ (rose). . . . .	85
3.1	Restauration aveugle avec une PSF <b>non-paramétrée</b> de l'image A, image simulée d'un système CLSM de trois billes : des coupes axiales $(Y, Z)$ des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode SGPAM, (d) restauration avec la méthode RRLAM, (e) vraie PSF $h^1$ , (f) PSF $\hat{h}^{(0)}$ utilisée à l'initialisation, (g) PSF $\hat{h}^1$ estimée par SGPAM, (h) PSF $\hat{h}^1$ estimée par RRLAM, (i) vraie PSF $h^2$ , (j) PSF $\hat{h}^{(0)}$ utilisée à l'initialisation, (k) PSF $\hat{h}^2$ estimée par SGPAM, (l) PSF $\hat{h}^2$ estimée par RRLAM. . . . .	110
3.2	(a) Profils d'intensité de l'image A le long de l'axe $(OZ)$ passant par les centres des trois billes originales (en bleu), des billes dégradées (en rouge), des billes restaurées avec SGPAM (en rose), des billes restaurées avec RRLAM (en vert), des billes restaurées avec une PSF SI et SGPAM (en noir). (b) et (c) Profils d'intensité le long de l'axe $(OZ)$ des PSFs prises respectivement en haut et en bas de l'échantillon. Les vraies PSFs sont présentées en bleu, les PSFs utilisées dans l'initialisation sont présentées en rouge, les PSFs estimées avec SGPAM sont présentées en rose, les PSFs estimées avec RRLAM sont présentées en vert. . . . .	111



3.3	Restauration aveugle avec une PSF <b>non-paramétrée</b> de l'image <i>B</i> , image simulée d'un système CLSM d'une coquille de bille : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d'une région (en bas de l'échantillon) de la coupe axiale : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode SG-PAM, (d) restauration avec la méthode RRLAM. . . . .	112
3.4	Restauration aveugle avec une PSF <b>non-paramétrée</b> de l'image <i>C</i> , image réelle d'une coquille de bille observée par un microscope confocal Zeiss LSM 780 ©INRA : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d'une région (en bas de l'échantillon) de la coupe axiale : (a) image observée, (b) restauration avec la méthode SGPAM, (c) restauration avec la méthode RRLAM, et (d) restauration avec la méthode SGPAM et une PSF SI. . . . .	113
3.5	Restauration aveugle avec une PSF <b>non-paramétrée</b> de l'image <i>D</i> , image biologique réelle de racines de plante observée par un microscope confocal Zeiss LSM 510 ©INRA. La première ligne montre des coupes radiales ( $X, Y$ ) à une profondeur de $5\mu m$ , la deuxième ligne montrent des coupes ( $X, Y$ ) à une profondeur de $10\mu m$ et la troisième ligne montre des coupes axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées. (a) image observée, (b) restauration avec la méthode SGPAM, (c) restauration avec la méthode RRLAM, et (d) restauration avec la méthode SGPAM et une PSF SI. . . . .	114
3.6	Décroissance de la fonctionnelle d'énergie globale en fonction des itérations pour la méthode SGPAM (en rouge) et la méthode RRLAM (en bleu). . . . .	115
3.7	Variation de la fonction de régularisation $J_1^R(\sigma) =$ en bleu et les régularisations $\frac{1}{\sigma^\lambda}$ , pour différentes valeurs de $\lambda > 0$ en fonction de $\sigma$ pour une PSF unidimensionnelle. . . . .	117
3.8	L'énergie d'attache aux données en rouge, l'énergie globale avec la régularisation $J_1^R(\theta)$ en bleu, et l'énergie globale avec la régularisation $J_2^R(\theta)$ en vert, en fonction de la variable $\omega_1$ . . . . .	121
3.9	Restauration aveugle avec une PSF <b>paramétrée</b> de l'image <i>A</i> , image simulée d'un système CLSM de trois billes : uniquement des coupes axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec une PSF gaussienne variable en profondeur, (d) restauration avec une PSF gaussienne SI, (e) vraie PSF $h^1$ , (f) première PSF gaussienne utilisée à l'initialisation, (g) première PSF gaussienne estimée $h_{\hat{\theta}_1}^G$ , (h) PSF gaussienne SI estimée par un algorithme de déconvolution aveugle, (i) vraie PSF $h^2$ , (j) seconde PSF gaussienne utilisée à l'initialisation, (k) seconde PSF gaussienne estimée $h_{\hat{\theta}_2}^G$ . . . . .	123



- 3.10 (a) Profils d'intensité de l'image A le long de l'axe ( $OZ$ ) passant par les centres des trois billes originales (en bleu), des billes dégradées (en rouge), des billes restaurées avec une combinaison de deux PSFs gaussiennes (en rose). (b) et (c) Profils d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) des PSFs prises respectivement en haut ( $d = 0\mu m$ ) et en bas ( $d = 14,5\mu m$ ) de l'échantillon. Les vraies PSFs sont présentées en bleu, les PSFs théoriques utilisées pour l'initialisation sont présentées en rouge, les PSFs gaussiennes (i.e. approximations des PSFs théoriques précédentes) utilisées dans l'initialisation sont présentées en rose, les PSFs gaussiennes estimées avec la méthode paramétrique proposée sont présentées en vert. . . . . 124
- 3.11 Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée** de l'image B, image simulée d'un système CLSM d'une coquille de bille : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d'une région (en bas de l'échantillon) de la coupe axiale : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec une PSF gaussienne variable en profondeur, (d) restauration avec une PSF gaussienne SI. . . . . 125
- 3.12 Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée** de l'image C, image réelle d'une coquille de bille observée par un microscope confocal Zeiss LSM 780 ©INRA : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d'une région (en bas de l'échantillon) de la coupe axiale : (a) image observée, (b) restauration avec une PSF gaussienne SV, (c) restauration avec une PSF gaussienne SI. . . . . 126
- 3.13 Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée** de l'image D, image biologique réelle de racines de plante observée par un microscope confocal Zeiss LSM 510 ©INRA. La première ligne montre des coupes radiales ( $X, Y$ ) à une profondeur de  $5\mu m$ , la deuxième ligne montrent des coupes ( $X, Y$ ) à une profondeur de  $10\mu m$  et la troisième ligne montre des coupes axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées : (a) image observée, (b) restauration avec une PSF gaussienne SV, (c) restauration avec une PSF gaussienne SI. . . . . 127
- 3.14 Coupes radiale et axiale de l'image simulée de coquille de bille, image B (a), et de son support (b). . . . . 129
- 3.15 Restauration aveugle avec une PSF **non-paramétrée et contrainte de support objet** de l'image B, image simulée d'un système CLSM d'une coquille de bille : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode SGPAM sans contrainte de support objet, (d) restauration avec la méthode SGPAM avec la contrainte de support objet. (e), (i), et (m) montrent des coupes axiales des vraies PSFs, (f), (j), et (n) montrent des coupes axiales des PSF de l'initialisation, (g), (k), et (o) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par SGPAM sans contrainte de support objet, (h), (l), et (p) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par SGPAM avec la contrainte de support objet. . . . . 130

3.16	(a) Profils d'intensité de l'image <i>B</i> le long de l'axe ( <i>OZ</i> ) passant par le milieu de l'image originale (en bleu), l'image dégradée (en rouge), l'image restaurée par SGPAM sans la contrainte de support objet (en rose), l'image restaurée par SGPAM avec la contrainte de support objet (en bleu ciel). (b), (c), et (d) Profils d'intensité le long de l'axe ( <i>OZ</i> ) des vraies PSFs (en bleu), des PSFs de l'initialisation (en rouge), des PSFs estimées par SGPAM sans la contrainte de support objet (en rose), et des PSFs estimées par SGPAM avec la contrainte de support objet (en bleu ciel). . . . .	131
3.17	Restauration aveugle avec une PSF <b>paramétrée et contrainte de support objet</b> de l'image <i>B</i> , image simulée d'un système CLSM d'une coquille de bille : des coupes axiales ( <i>Y, Z</i> ) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode paramétrique sans contrainte de support objet, (d) restauration avec la méthode paramétrique avec la contrainte de support objet. (e), (i), et (m) montrent des coupes axiales des vraies PSFs, (f), (j), et (n) montrent des coupes axiales des PSF gaussienne de l'initialisation, (g), (k), et (o) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par la méthode paramétrique sans contrainte de support objet, (h), (l), et (p) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par la méthode paramétrique avec la contrainte de support objet. . . . .	134
4.1	Restauration aveugle de l'image <i>B</i> <b>avec contrainte de phase sur la PSF</b> : des coupes axiales ( <i>Y, Z</i> ) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec contrainte de phase sur la PSF, (d) restauration avec contrainte de phase sur la PSF et contrainte de support sur l'objet. (e), (i), et (m) montrent des coupes axiales des vraies PSFs, (f), (j), et (n) montrent des coupes axiales des PSF de l'initialisation, (g), (k), et (o) montrent des coupes axiales des PSFs estimées avec contrainte de phase sur la PSF, (h), (l), et (p) montrent des coupes axiales des PSFs estimées avec contrainte de phase sur la PSF et contrainte de support sur l'objet. . . . .	139
C.1	Technique d'holographie : interférence de l'onde diffractée avec l'onde de référence. . . . .	152
C.2	Le vecteur de l'onde diffractée décrit une calotte de sphère dans la taille est limitée par l'ouverture numérique du système optique. . . . .	154
C.3	La variation de l'angle d'illumination entre $-\frac{\pi}{2}$ et $+\frac{\pi}{2}$ permet l'enregistrement d'un ensemble de calottes de sphères dans Fourier (gauche), celles-ci remplissent le volume d'un tore qui correspond au support fréquentiel de l'objet. Une coupe axiale de la forme obtenue est présentée à droite. . . . .	154
C.4	Coupes radiales (première ligne), et axiales (deuxième ligne) des images CLSM et TDM d'un grain de pollen : (a) montre l'image de microscopie de fluorescence confocale, (b) et (c) montrent respectivement les parties réelle et imaginaire de tomographie diffractive. Les axes ( <i>OX</i> ) et ( <i>OY</i> ) sont inversés dans les images CLSM et TDM. . . . .	156

---

C.5	Coupes radiale (a) et axiale (b) du module de la transformée de Fourier de l'image de grain de pollen (à valeurs complexe) obtenue par la tomographie diffractive . . . . .	156
-----	---	-----



# Liste des Abréviations

- **IR** : Indice de Réfraction
- **SI** : Spatialement Invariable
- **SV** : Spatialement Variable
- **PSF** : Point Spread Function
- **TF** : Transformée de Fourier
- **SGP** : Scaled Gradient Projection
- **SGPAM** : Scaled Gradient Projection embedded in Alternate Minimization scheme
- **RRL** : Regularized Richardson-Lucy
- **RRLAM** : Regularized Richardson-Lucy embedded in Alternate Minimization scheme
- **MLEM** : Maximum Likelihood Expectation-Maximization
- **EMMA** : Enhanced Merging Masks Algorithm
- **NFP** : Nominal Focal Position
- **AFP** : Actual Focal Position
- **MAP** : Maximum A Posteriori
- **MAPJ** : Maximum A Posteriori Joint
- **MV** : Maximum de Vraisemblance
- **CLSM** : Confocal Laser Scanning Microscopy
- **WFM** : Wide Field Microscopy
- **TDM** : Tomographic Diffractive Microscopy
- **STED** : STimulated-Emission-Depletion
- **NA** : Numerical Aperture
- **SNR** : Signal-to-Noise Ratio
- **PSNR** : Peak Signal-to-Noise Ratio
- **MSE** : Mean Square Error
- **NMSE** : Normalized Mean Square Error
- **SSIM** : Structural SIMilarity index
- **GS** : Gerchberg-Saxton



# Notations

- $\lambda$  : longueur d'onde dans le vide,
- $\lambda_{em}$  : longueur d'onde de la lumière d'émission,
- $\lambda_{ex}$  : longueur d'onde de la lumière d'excitation,
- $n_i$  : indice de réfraction du milieu d'immersion,
- $n_s$  : indice de réfraction du spécimen,
- $\theta_i$  : angle que fait le rayon lumineux dans le milieu d'immersion avec l'axe optique ( $OZ$ ),
- $\theta_s$  : angle que fait le rayon lumineux dans le spécimen avec l'axe optique ( $OZ$ ),
- $\theta_{max}$  : angle que fait le rayon lumineux le plus extrême pénétrant dans l'objectif avec l'axe optique ( $OZ$ ),
- $h_{ill}$  : PSF cohérente d'illumination,
- $h_{det}$  : PSF cohérente de détection,
- $h_A$  : PSF cohérente associée à une longueur d'onde  $\lambda$ ,
- $h_{WFM}^t$  : PSF en microscope à champ large,
- $h_{CLSM}^t$  : PSF en microscopie confocale,
- $k = (k_x, k_y, k_z) \in \mathbb{R}^3$  : coordonnées fréquentielles,
- $P(k_x, k_y, z)$  : fonction pupille,
- $d$  : profondeur du point imagé,
- $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$  : nombre d'onde de la lumière dans le vide,
- $\varphi_d(\theta_i, z)$  : phase de défocalisation,
- $\varphi_a(\theta_i, \theta_s)$  : phase de d'aberration,
- $\mathcal{O}$  : un ensemble borné de  $\mathbb{R}^3$ , qui désigne l'espace objet,
- $\mathcal{I}$  : un ensemble borné de  $\mathbb{R}^3$ , qui désigne l'espace image,
- $u' = (x', y', z') \in \mathcal{O}$  : coordonnées spatiales dans le domaine objet,
- $u = (x, y, z) \in \mathcal{I}$  : coordonnées spatiales dans le domaine image,
- $f \in \mathcal{L}^1(\mathcal{O}, \mathbb{R}^+)$  : l'image originale,
- $\tilde{H} : \mathcal{L}^1(\mathcal{O}, \mathbb{R}^+) \rightarrow \mathcal{L}^1(\mathcal{I}, \mathbb{R}^+)$  : opérateur de flou spatialement variable,
- $H : \mathcal{L}^1(\mathcal{I}, \mathbb{R}^+) \rightarrow \mathcal{L}^1(\mathcal{I}, \mathbb{R}^+)$  : opérateur de flou spatialement invariable,
- $q \in \mathcal{L}^1(\mathcal{I}, \mathbb{R}^+)$  : l'image floue (i.e.  $q = \tilde{H}(f)$ ),
- $\mathcal{I}^d$  : un ensemble borné de  $\mathbb{N}^3$ , qui désigne l'espace image discrétisé,
- $q^d : \mathcal{I}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  : une version discrétisée de l'image floue (i.e.  $q^d(i) = \int_{V_i} q(u) du = \int_{V_i} \tilde{H}(f) du, \forall i \in \mathcal{I}^d$  et  $V_i$  un volume élémentaire de  $\mathcal{I}$ ),
- $\mathcal{P}(\cdot)$  : statistique de Poisson,
- $b_g$  : constante de bruit de fond,
- $g : \mathcal{I}^d \rightarrow \mathbb{N}$  : l'image floue et bruitée  $g \sim \mathcal{P}(q^d + b_g)$ ,
- $\tilde{h} \in \mathcal{L}^1(\mathcal{O} \times \mathcal{I}, \mathbb{R}^+)$  : la PSF spatialement variable,
- $h \in \mathcal{L}^1(\mathcal{I}, \mathbb{R}^+)$  : la PSF spatialement invariable,
- $f : \mathcal{I}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  : la version discrète de  $f$ ,

- $\tilde{h} : \mathcal{J}^d \times \mathcal{J}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  : la version discrète de la PSF spatialement variable  $\tilde{h}$ ,
- $h : \mathcal{J}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  : la version discrète de la PSF spatialement invariable  $h$ ,
- $\tilde{H}(\cdot)$  : l'opérateur de flou spatialement variable défini pour des fonctions à variables discrètes,
- $H(\cdot)$  : l'opérateur de flou spatialement invariable défini pour des fonctions à variables discrètes,
- $\psi^i$  : fonction de pondération,
- $\tilde{\tilde{H}}$  : approximation de l'opérateur de flou spatialement variable  $\tilde{H}$  par  $\tilde{\tilde{H}}(f) = \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i \cdot (h^i * f)$ ,
- $\tilde{\tilde{h}}$  : approximation de la PSF spatialement variable  $\tilde{h}$  par  $\tilde{\tilde{h}}(u, u') = \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u) \cdot h^i(u - u')$ ,
- $\tilde{\tilde{H}}$  : approximation de l'opérateur de flou spatialement variable  $\tilde{H}$  par  $\tilde{\tilde{H}}(f) = \sum_{1 \leq i \leq M} h^i * (\psi^i \cdot f)$ ,
- $\tilde{\tilde{h}}$  : approximation de la PSF spatialement variable  $\tilde{H}$  par  $\tilde{\tilde{h}}(u, u') = \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u') \cdot h^i(u - u')$ ,
- $\mathbf{f} \in \mathbb{R}^n$  : vecteur représentant l'image nette,
- $\mathbf{H} \in \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^n$  : matrice contenant les coefficients de la PSF spatialement invariable,
- $\mathbf{F} \in \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^n$  : matrice représentant la convolution par l'image originale,
- $\mathbf{h} \in \mathbb{R}^n$  : un vecteur qui représente la PSF,
- $\tilde{\mathbf{H}} \in \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^n$  : matrice contenant les coefficients de la PSF spatialement variable,
- $n$  : nombre de voxels dans l'image,
- $n_x, n_y, n_z$ , taille de l'image suivant chacune des dimensions,
- $h^\theta$  : PSF gaussienne,
- $\theta$  : paramètres de la PSF gaussienne,
- $\sigma_r$  : écart type radial de la PSF gaussienne,
- $\sigma_z$  : écart type axial de la PSF gaussienne,
- $\text{supp}(h)$  : le support de la fonction  $h$ ,
- $\mathcal{J}^d$  : l'ensemble des fonctions à variables dans  $\mathcal{J}^d$  et à valeur dans  $\mathbb{R}^+$ ,
- $BV(\mathbb{R}^3)$  : l'espace des fonctions à variations bornées,
- $H^1(\mathcal{J}) = \left\{ h \in L^2(\mathcal{J}), \nabla h \in L^2(\mathcal{J})^3 \right\}$ ,
- $\mathcal{H} = \left\{ h \in H^1(\mathcal{J}); h \geq 0; \int_{\mathcal{J}} h(u) du = 1 \right\}$ ,
- $\mathcal{F} = \left\{ f \in BV(\mathbb{R}^3); f \geq 0; \mathcal{J}\text{-périodique} \right\}$ ,
- $\mathcal{F}_c = \left\{ f \in \mathcal{F}; \int_{\mathcal{J}} f(u) du = c \right\}$  avec  $0 < c < +\infty$  une constante positive.



# Introduction générale

---

## Cadre général

Depuis son invention, la microscopie optique par fluorescence est devenue l'instrument le plus couramment utilisé par les biologistes en raison de sa capacité de visualiser en trois dimensions des particules et des tissus cellulaires vivants à l'échelle du micromètre. La technique de détection par fluorescence permet d'observer des zones spécifiques qui émettent de la fluorescence suite à une excitation lumineuse adaptée. Dès lors, une grande variété de marqueurs fluorescents a été développés pour colorer des zones d'intérêt spécifiques dans des spécimens biologiques. Grâce à une technique de sectionnement optique, l'information mesurée par la microscopie optique est tridimensionnelle, celle-ci est reconstruite numériquement par un ordinateur relié au microscope.

Ces dernières décennies, la recherche dans le domaine de la microscopie et de l'optique s'est considérablement évoluée et a donné naissance à plusieurs types de microscopies afin de satisfaire le besoin des biologistes en qualité et précision d'imagerie. La *microscopie confocale* est en particulier l'une des inventions marquantes en raison de sa capacité à offrir une bonne résolution en comparaison à la microscopie classique (de l'ordre de quelques centaines de nanomètres) [Pawley 2006]. Elle a été introduite par Marvin Minsky en 1953 [Minsky 1988], mais n'a été commercialisée que plus récemment vers la fin des années 1980. Nous nous intéressons principalement dans cette thèse à ce type d'instrumentation qui a aujourd'hui envahit de nombreux laboratoires biomédicaux et plusieurs autres domaines comme la science des matériaux.

Malgré les considérables progrès dans le domaine de la microscopie et de l'optique, l'image de microscopie de fluorescence reste à présent limitée en qualité. Ces limitations sont essentiellement dues aux propriétés intrinsèques des instruments optiques et aux propriétés physiques du spécimen imagé. La diffraction de la lumière à travers les lentilles et la contribution de la lumière hors focalisation aboutissent à la présence du flou dans l'image enregistrée. Ce flou peut varier dans l'image à cause des aberrations optiques. Ces aberrations sont essentiellement dues aux changements des indices de réfractions entre les différents milieux composant le microscope et le spécimen. Par ailleurs, l'image enregistrée subit aussi d'autres fluctuations comme le bruit lié au processus de détection de la lumière au niveau du capteur. L'amélioration de ces images est donc une problématique qui a occupé différentes communautés (biologistes, physiciens, mathématiciens, informaticiens). Deux voies d'améliorations ont été explorées. La première voie, matérielle, a donné naissance à différents nouveaux dispositifs d'imagerie comme par exemple la microscopie multiphotonique [König 2001]. La seconde voie est les méthodes numériques dans lesquelles le processus de formation d'image est modélisé par des formules mathématiques

que l'on cherche à inverser. C'est la problématique de la restauration numérique d'image qui est le sujet de ce travail.

Dans la plupart des méthodes de restauration, le flou est supposé linéaire et invariable spatialement (SI). Le modèle mathématique d'observation est donc représenté par une convolution par une fonction de flou tridimensionnelle qui représente la réponse impulsionnelle du microscope. Cette dernière est aussi appelée *fonction d'étalement de point* ou "*Point Spread Function*" (PSF) en anglais. Une large gamme d'algorithmes de déconvolution ont été développés dans la littérature pour l'inversion de ce modèle [Dey 2006].

Néanmoins, en présence d'aberration optique, la réponse impulsionnelle n'est plus la même en tout point de l'image. Celle-ci varie suivant la distribution des indices de réfraction entre les différents milieux composant le microscope et le spécimen. Par conséquent, la convolution n'est plus une bonne modélisation du processus de formation d'image. Par ailleurs, la considération d'une PSF différente en tout point de l'image conduit à un temps de calcul prohibitif.

Il existe des méthodes de restauration d'image affectée par les aberrations, aussi bien en biologie qu'en d'autres domaines comme l'astronomie. La plupart des approches qui existent dans la littérature sont, soit très simplistes conduisant à une mauvaise reconstruction, soit précises mais très demandeuses en temps de calcul, ce qui limite leur utilisation pour des images volumineuses de microscopie de fluorescence.

L'objectif de cette thèse est de développer des méthodes de restauration d'images microscopiques 3D affectées par les aberrations optiques, tout en assurant un temps de calcul raisonnable. Deux cadres d'estimation sont considérés dans cette thèse. Le premier est le cadre d'estimation non-aveugle dans lequel la PSF est supposée connue. Le deuxième est le cadre d'estimation aveugle dans lequel la PSF est supposée inconnue.

## Principales contributions

Nous donnons ici les principales contributions de cette thèse pour la restauration d'image microscopique 3D en présence d'aberrations optiques :

- Nous étudions l'impact des aberrations optiques sur le comportement de la réponse impulsionnelle. En vue de limiter le nombre de paramètres de la PSF lors de l'estimation de celle-ci, nous étudions l'approximation gaussienne de la réponse impulsionnelle.
- Nous étudions les modèles d'approximation du flou spatialement variable (SV) du fait que l'utilisation d'une PSF différente en tout point de l'image est rédhibitoire en terme de temps de calcul. Nous montrons qu'un modèle similaire à celui présenté dans [Hirsch 2010] permet d'assurer un bon compromis entre le temps de calcul et la précision d'approximation. Dans ce modèle, la PSF SV est approchée par une combinaison convexe d'un ensemble de PSF SI.

- Nous proposons deux méthodes rapides de restauration non-aveugle permettant l'inversion du modèle de flou SV considéré. La première méthode est adaptée au bruit gaussien présent dans les images de microscopie de fluorescence à champ large et la deuxième méthode est adaptée au bruit poissonien présent dans les images de microscopie confocale. Nous comparons ces méthodes avec l'une des méthodes de l'état de l'art [Maalouf 2010].
- Nous proposons deux méthodes de restauration aveugle dans lesquelles l'image nette et l'ensemble des PSFs SI sont conjointement estimées. Dans la première méthode, nous ne considérons aucune paramétrisation de la PSF, nous estimons les intensités des PSFs SI en chaque voxel de leur support afin de laisser une grande liberté sur la forme de celles-ci. Dans la deuxième méthode, nous considérons une paramétrisation gaussienne des PSFs, nous estimons alors les paramètres des fonctions gaussiennes. Ceci réduit le nombre de variables à estimer et l'espace des solutions possibles, et contraint aussi la forme des PSFs. Nous testons et comparons ces deux approches d'estimation sur des images simulées et réelles de microscopie de fluorescence.
- Nous étudions mathématiquement la question de l'existence d'une solution au problème de minimisation de fonctionnelle définie pour la restauration aveugle.
- Nous proposons de rajouter une contrainte de phase sur la PSF afin d'améliorer encore l'estimation de celle-ci.

## Organisation du manuscrit

Nous décomposons ce manuscrit en quatre chapitres :

- Le premier chapitre introduit la microscopie de fluorescence, les différentes sources de dégradations dans celle-ci, et la formulation mathématique de ces dégradations. Nous présentons également un modèle que nous utilisons dans cette thèse pour le calcul numérique de la réponse impulsionnelle du microscope, qui prend en compte les aberrations optiques. Nous étudions l'impact des aberrations sur le comportement de la PSF et étudions l'approximation de cette dernière par une fonction gaussienne.
- Le deuxième chapitre est dédié à la restauration non-aveugle de l'image de microscopie de fluorescence. Dans ce chapitre, nous présentons tout d'abord l'état de l'art sur les méthodes de restauration. Nous présentons ensuite notre approche de restauration en présence d'aberration dans laquelle la PSF SV est approchée par une combinaison convexe d'un ensemble de PSFs SI. Deux critères sont considérés selon que l'on s'intéresse à la microscopie à champ large ou confocale. Pour chacun d'eux, nous proposons un algorithme rapide d'optimisation adapté. Nous appliquons deux méthodes rapides d'optimisation suivant le critère considéré. Nous comparons finalement ces méthodes à l'une des méthodes de l'état de l'art sur des données simulées et réelles.
- Le troisième chapitre est consacré au problème de restauration aveugle dans lequel la PSF SV est supposée inconnue. Après avoir présenté l'état de l'art, nous

présentons deux méthodes d'estimation jointe de la PSF SV et de l'image nette. Dans la première méthode non-paramétrique, la PSF est estimée en tout point de son volume pour assurer une liberté d'évolution de sa forme, tandis que dans la deuxième méthode paramétrique, la forme de la PSF est contrainte par la paramétrisation gaussienne dans le but de réduire le nombre de variables à estimer et l'espace des solutions possibles.

- Dans le quatrième chapitre, nous clôturons ce thèse en proposant certaines perspectives de travail. En vue d'améliorer les méthodes précédentes, nous proposons de contraindre encore la PSF en la modélisant par sa phase de défocalisation (connue par le système optique) et sa phase d'aberration (inconnue). Une méthode d'estimation de la phase est ajoutée à l'estimation jointe du chapitre 2 afin de prendre en compte des contraintes sur la PSF à la fois dans le domaine spatial et dans le domaine fréquentiel.

# Microscopie de fluorescence 3D

## Sommaire

<b>1.1</b>	<b>Présentation du système</b>	<b>6</b>
1.1.1	Phénomène de fluorescence	6
1.1.2	Microscopie de fluorescence conventionnelle	7
1.1.3	Microscopie de fluorescence confocale	8
<b>1.2</b>	<b>Les principales distorsions</b>	<b>8</b>
1.2.1	Flou	10
1.2.2	Bruit	17
<b>1.3</b>	<b>Formulation mathématique</b>	<b>18</b>
1.3.1	Notations mathématiques	18
1.3.2	Modèle de flou	19
1.3.3	Modèle de bruit	21
<b>1.4</b>	<b>Modélisation de la PSF</b>	<b>22</b>
1.4.1	Modèle de Stokseth	23
1.4.2	Étude des PSFs avec aberrations	27
1.4.3	Approximation gaussienne de la PSF	31
<b>1.5</b>	<b>Amélioration de la résolution : solutions matérielles</b>	<b>36</b>

## Introduction

Permettant d'observer des cellules à l'échelle de quelques centaines de nanomètres, la microscopie de fluorescence tridimensionnelle (3D) est devenue l'instrument incontournable des biologistes. Néanmoins, l'utilisation d'un tel instrument reste aujourd'hui limitée à cause des artéfacts que présentent les images issues de ce système optique. Ces artéfacts liés aux propriétés intrinsèques des instruments optiques et aux propriétés physiques des capteur et du spécimen imagé, sont inévitables. L'information mesurée est principalement entachée par deux types de distorsions : un flou qui n'est pas homogène dans le volume de l'objet et un bruit qui dépend de l'objet observé. Afin de s'affranchir de ces distorsions et obtenir une image de meilleure qualité, il est essentiel de comprendre les origines de ces distorsions. Le but de ce premier chapitre est alors de présenter tout d'abord le système de microscopie de fluorescence 3D et d'identifier ensuite les différentes sources de distorsions qui peuvent affecter ces images. À partir de cela, nous donnons une formulation mathématique de la chaîne de dégradation d'image qui sera considérée dans cette thèse. Enfin, nous présentons quelques solutions matérielles qui ont été proposées pour améliorer la résolution des images d'un tel instrument.

## 1.1 Présentation du système

Le principe de fonctionnement de la microscopie de fluorescence [Fujimoto 2009] est fondé sur le phénomène de fluorescence que possède certaines substances. Nous définissons ici ce phénomène, ensuite nous introduisons les deux types de microscopies de fluorescence auxquelles nous nous intéressons dans cette thèse : la microscopie de fluorescence conventionnelle ou à champ large et la microscopie de fluorescence confocale.

### 1.1.1 Phénomène de fluorescence

La *fluorescence* est une faculté de luminescence dont disposent certaines substances. Elle est basée sur une variation des niveaux d'énergie des molécules. Sous l'effet d'une irradiation lumineuse appropriée, la molécule absorbe les photons et change d'état énergétique. Elle passe d'un état d'équilibre à état excité et passe à un niveau d'énergie supérieur. Pour retrouver son état fondamental, la molécule perd la même quantité d'énergie absorbée par dissipation sous la forme d'émission d'un photon. Le diagramme de Jablonski [Lakowicz 2006, Valeur 2012] présenté dans la figure 1.1 illustre cette variation de niveau d'énergie aboutissant au phénomène de fluorescence.

L'énergie émise sous forme lumineuse ( $E_{em} \propto \frac{1}{\lambda_{em}}$ ,  $\lambda_{em}$  étant la longueur d'onde de la lumière d'émission) est donc inférieure à l'énergie d'excitation ( $E_{ex} \propto \frac{1}{\lambda_{ex}}$ ,  $\lambda_{ex}$  étant la longueur d'onde de la lumière d'excitation). En conséquence, la longueur d'onde de la lumière d'émission  $\lambda_{em}$  est toujours plus élevée que la longueur d'onde de la lumière d'excitation  $\lambda_{ex}$ . On parle de déplacement spectral de Stokes [Lakowicz 2006] (voir figure 1.2).

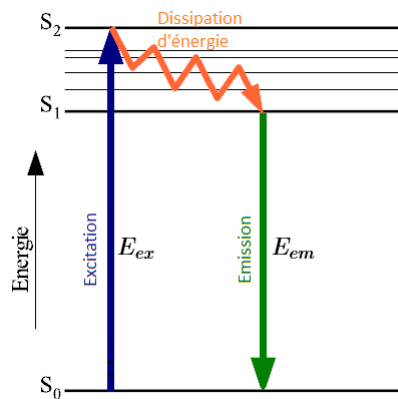


FIGURE 1.1 – Diagramme de Jablonski des états énergétiques de la fluorescence : En absorbant un photon, la molécule passe d'un état d'équilibre  $S_0$  à un niveau d'énergie supérieur  $S_2$ . Pendant cet état d'excitation, la molécule perd une partie de son énergie par dissipation et atteint le niveau d'énergie  $S_1$ . Pour retrouver son état fondamental  $S_0$ , la molécule émet un photon avec une énergie  $E_{em}$ , qui est inférieure à celle absorbée  $E_{ex}$ .

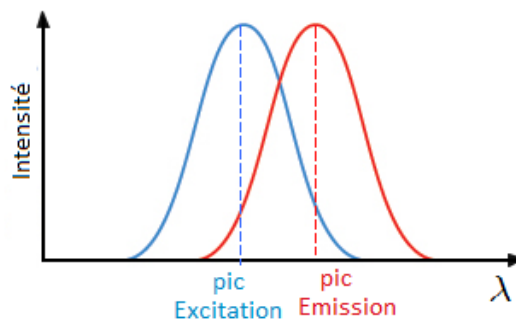


FIGURE 1.2 – Déplacement de Stokes : Le spectre d'émission (la courbe en rouge) est toujours décalé par rapport au spectre d'excitation (la courbe en bleu) dans la direction des longueurs d'onde  $\lambda$  supérieures.

### 1.1.2 Microscopie de fluorescence conventionnelle

L'imagerie de fluorescence est basée sur le phénomène de fluorescence décrit ci-dessus. L'image collectée par le détecteur est formée par la lumière émise par un spécimen fluorescent, après sa stimulation par une onde d'excitation. Un marqueur fluorescent ou *fluorochrome* est souvent utilisé pour colorer l'échantillon, ce qui permet d'observer des structures cellulaires dans un spécimen translucide par augmentation du contraste. Ces fluorochromes sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation lumineuse. Divers types de fluorochromes ont été développés par les biologistes en fonction des applications et des propriétés des molécules que l'on souhaite observer. Par exemple, le DAPI est un fluorochrome qui est capable de se lier à l'ADN, ce qui permet de visualiser les noyaux des cellules.

Dans la *microscopie de fluorescence conventionnelle*, aussi appelée à *champ large* ou à *epifluorescence*, l'excitation de ces photons est réalisée par une source spectralement étendue (lumière blanche). Tout fluorochrome se trouvant sur la trajectoire de cette lumière émet des photons dans toutes les directions. Seulement une partie de ces photons émis sera collectée par l'objectif du microscope. L'ouverture numérique du microscope caractérise le cône d'acceptance limite des photons (tout photon à l'extérieur de ce cône ne participe pas à la formation de l'image), cf figure 1.5. Ces photons sont ensuite collectés par le détecteur, une caméra CCD (Charge-Coupled Device, ou dispositif à transfert de charge) où l'image sera formée. Une série de coupes transversales du volume de l'objet est enregistrée sur le détecteur, ce qui permet d'obtenir une image de l'échantillon en trois dimensions (3D). Cette technique de coupes sériées optiques est réalisée par la variation du plan de focalisation soit par le déplacement relatif de la platine portant l'échantillon, soit par le déplacement de l'objectif.

Notons que les ondes d'illumination et de détection étant spectralement dissociées (cf. figure 1.2), elles sont différenciées par un dispositif optique (filtre dichroïque). Un miroir dichroïque et un jeu de filtres optiques servent à sélectionner les longueurs d'onde d'exci-

tation et d'émission et ainsi à accorder le système en fonction des spectres absorption et d'émission du marqueur fluorescent.

Figure 1.3 (a) montre les chemins optiques pour la détection d'un point dans le plan focal de l'objectif. Notons aussi que dans la microscopie conventionnelle, l'image d'un point en dehors du plan de focalisation est aussi présente dans le plan de détection. De ce fait, l'image d'un plan, si elle contient bien l'information du plan observé, est aussi dégradée par les informations en provenance des autres plans.

### 1.1.3 Microscopie de fluorescence confocale

La *microscopie confocale à balayage laser* (en anglais "Confocal Laser Scanning Microscopy", CLSM) [Inoué 2006, Pawley 2006] est venue pour pallier le défaut de la microscopie conventionnelle. En effet, dans la microscopie classique, l'ensemble du spécimen est illuminé et la lumière de fluorescence détectée provient de l'ensemble de l'échantillon. L'amélioration de la résolution en CLSM vient d'un filtrage spatial des photons. La lampe d'illumination est remplacée par une source cohérente, et un sténopé (ou pinhole en anglais), placé au foyer optique de l'objectif, améliore la focalisation du faisceau laser sur l'échantillon. Un second sténopé, placé au foyer optique conjugué de l'objectif, d'où le nom de "con-focal", filtre les photons en provenance des plans non-focaux et à destination du détecteur (cf. figure 1.3 (b)). Le dispositif ainsi décrit représente une imagerie ponctuelle (une zone infiniment petite), l'information bidimensionnelle est alors obtenue par un balayage du faisceau laser sur l'ensemble de la zone d'analyse de l'échantillon. Le balayage d'un plan se fait ligne par ligne suivant les axes ( $OX$ ) et ( $OY$ ) par rotation des miroirs des galvanomètres. Le déplacement suivant l'axe optique ( $OZ$ ) est effectué grâce au déplacement de l'objectif ou le spécimen, ce qui permet de reconstruire numériquement l'image 3D par un ordinateur relié au microscope.

La microscopie confocale offre une résolution axiale supérieure à la microscopie conventionnelle. Cependant le réglage de l'ouverture du sténopé la rend plus difficile à utiliser : si cette ouverture est trop petite, le détecteur ne captera pas assez de photons pour former une image de bonne qualité en termes de rapport signal sur bruit ; si elle est trop grande, le gain de résolution sera diminué par la collection des photons hors du plan de focalisation.

Dans cette thèse, nous nous intéressons principalement à ce type d'instrumentation i.e. microscopie de fluorescence confocale.

## 1.2 Les principales distorsions

Différents éléments contribuent à la distorsion de l'image de microscopie de fluorescence. Chaque élément ajoute des dégradations provenant d'une construction imparfaite, ou de phénomènes physiques difficiles à éviter. L'image mesurée présente un flou et un bruit qui peuvent être plus ou moins réduits suivant les conditions d'acquisition. La figure 1.4 présentant des coupes d'une image 3D de cellules d'une plante de muguet (*convallaria*



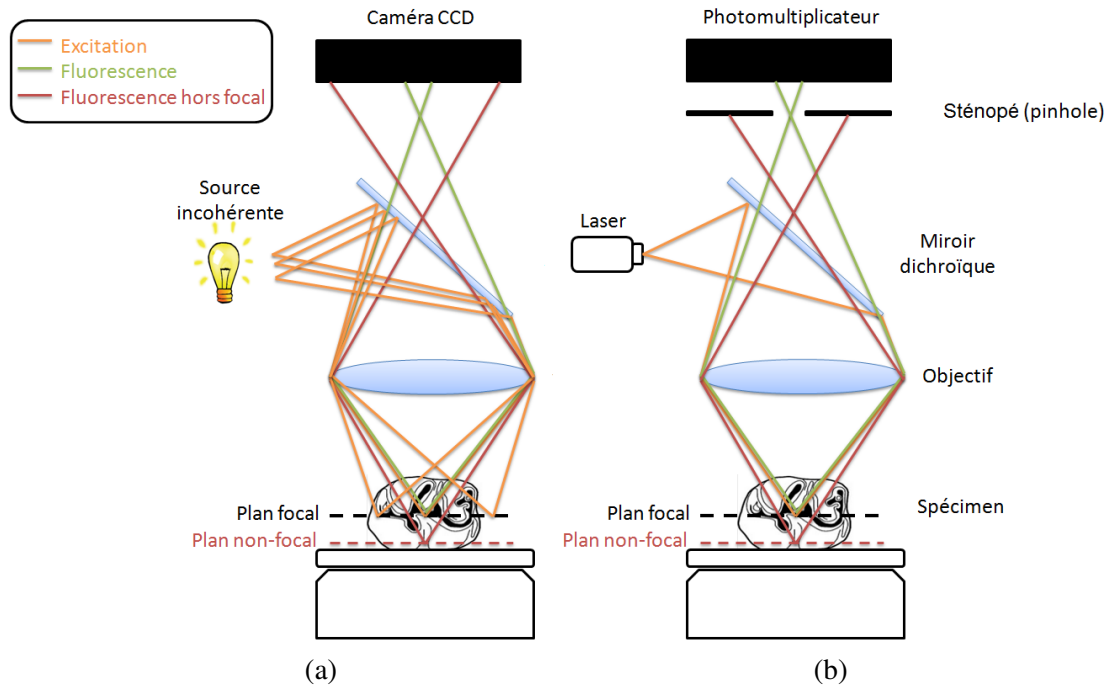


FIGURE 1.3 – Présentation des principales techniques de microscopie de fluorescence. (a) La microscopie à champ large, (b) la microscopie confocale : le sténopé filtre la lumière provenant des plans hors-focalisation.

majalis) prise par un microscope confocal, illustre combien les images CLSM sont corrompues par ces deux types de distorsions. Nous discutons dans cette section les origines de ces distorsions.

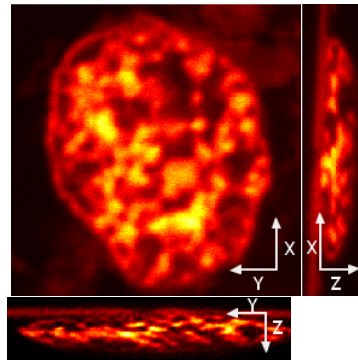


FIGURE 1.4 – Coupes d'une image 3D de cellules de muguet (*convallaria majalis*) prise avec un microscope confocal de type LSM 780 ©INRA. Les paramètres d'acquisition de cette image sont les suivants : objectif à immersion avec une ouverture numérique de 1.4, les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation sont respectivement centrés à  $560\text{nm}$  et  $600\text{nm}$ . Les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement  $50\text{nm}$  et  $150\text{nm}$ , pour respecter l'échantillonnage de Nyquist.

### 1.2.1 Flou

Nous proposons ici de faire un tour sur les principales phénomènes physiques contribuant à l'apparition du flou sur les images de microscopie de fluorescence.

#### 1.2.1.1 Diffraction

La *diffraction* [Sharma 2006] est un phénomène optique qui apparaît lorsque la lumière interagit avec des objets ou d'ouvertures de taille similaire ou plus petite que sa longueur d'onde. En effet, lorsque la lumière provenant d'une source ponctuelle traverse une ouverture circulaire de très petite taille, elle ne produit pas un point lumineux comme image, mais un disque central brillant entouré par de nombreux anneaux concentriques, comme présenté dans la figure 1.6. Cette image de diffraction est connue sous le nom de "tâche d'Airy". La diffraction est considérée comme l'une des sources de dégradation les plus importantes puisque tous les instruments optiques sont formés de petites ouvertures circulaires. La microscopie de fluorescence en particulier possède un ensemble de lentilles condensées dans l'objectif dont la taille est limitée par son ouverture numérique. Soient  $\theta_{max}$  l'angle que forme, avec l'axe optique ( $OZ$ ), le rayon le plus extrême pénétrant dans l'objectif et  $n_i$  l'indice de réfraction du milieu d'immersion. L'ouverture numérique que l'on note par  $NA$  pour "Numerical Aperture" en anglais, reflète la quantité de lumière qui pénètre dans l'objectif (cf. figure 1.5). Elle s'exprime comme suit :

$$NA = n_i \sin(\theta_{max}) \quad (1.1)$$

Lorsque l'ouverture numérique est faible (i.e.  $NA \leq 0,7$ ), le système est considéré *paraxial* et lorsqu'elle est élevée (i.e.  $NA \geq 0,7$ ), le système est considéré *non-paraxial* [Pankajakshan 2009a]. Un objectif est dit *à sec* quand l'objectif et la lamelle sont séparés par de l'air ( $n_{air} = 1$ ). Il est dit *à immersion* quand le milieu est de l'eau ( $n_{eau} = 1,33$ ) ou de l'huile ( $n_{huile} \geq 1,5$ ).

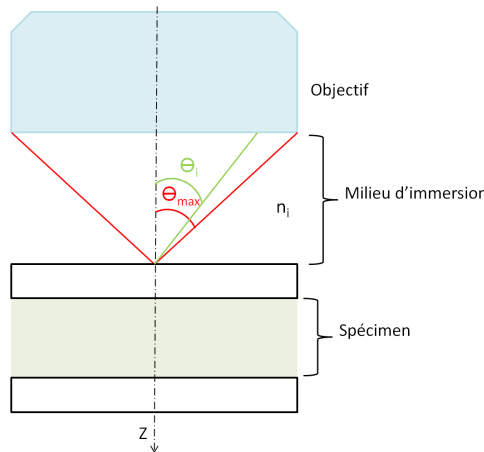


FIGURE 1.5 – L'ouverture numérique  $NA = n_i \sin(\theta_{max})$  détermine l'angle maximale  $\theta_{max}$  que fait le rayon le plus écarté possible qui peut rentrer dans l'objectif, avec l'axe optique ( $OZ$ ).

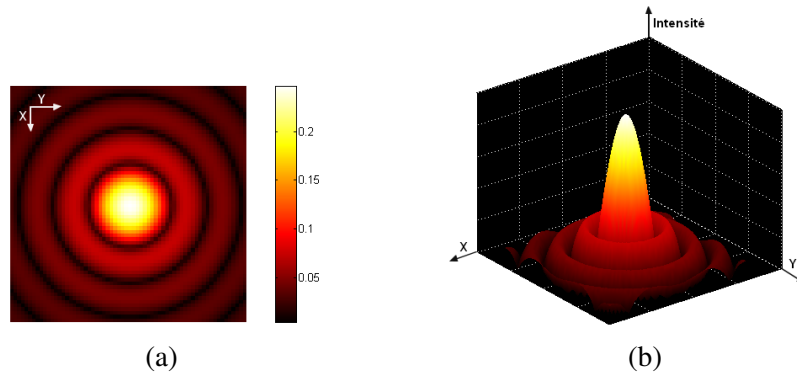


FIGURE 1.6 – Image de diffraction : (a) image de la tâche d’Airy en 2D, (b) représentation en 3D, la troisième dimension étant l’intensité.

#### 1.2.1.1.a Limite de résolution

La résolution latérale du microscope est limitée par la diffraction. La résolution est définie comme étant la distance minimale séparant deux points discernables, lorsqu’ils sont vus à travers l’instrument. Le critère de Rayleigh est communément utilisé pour déterminer cette valeur. En d’autres termes, deux objets ponctuels sont tout juste résolus suivant le critère de Rayleigh, si le maximum central de la figure de diffraction du premier point coïncide avec le premier minimum de la figure de diffraction du second point (cf. figure 1.7). La résolution peut varier suivant le type d’instrument. Nous donnons l’expression de celle-ci telle qu’elle est présentée dans [De Meyer 2008] :

- Pour un microscope conventionnel, la résolution latérale est :

$$R_{XY}^{WFM} = \frac{0,61\lambda_{em}}{NA} \quad (1.2)$$

- Pour un microscope confocal, la résolution latérale est :

$$R_{XY}^{CLSM} = \frac{0,4\lambda_{em}}{NA} \quad (1.3)$$

avec  $\lambda_{em}$  la longueur d’onde de la lumière d’émission. Ainsi, le pouvoir de résolution latérale d’un objectif est proportionnel à la longueur d’onde de  $\lambda_{em}$  et inversement proportionnel à son ouverture numérique  $NA$ . Dans la pratique, des objectifs à haute ouverture numérique seront donc choisis pour réduire la taille de la tâche de diffraction et améliorer la résolution.

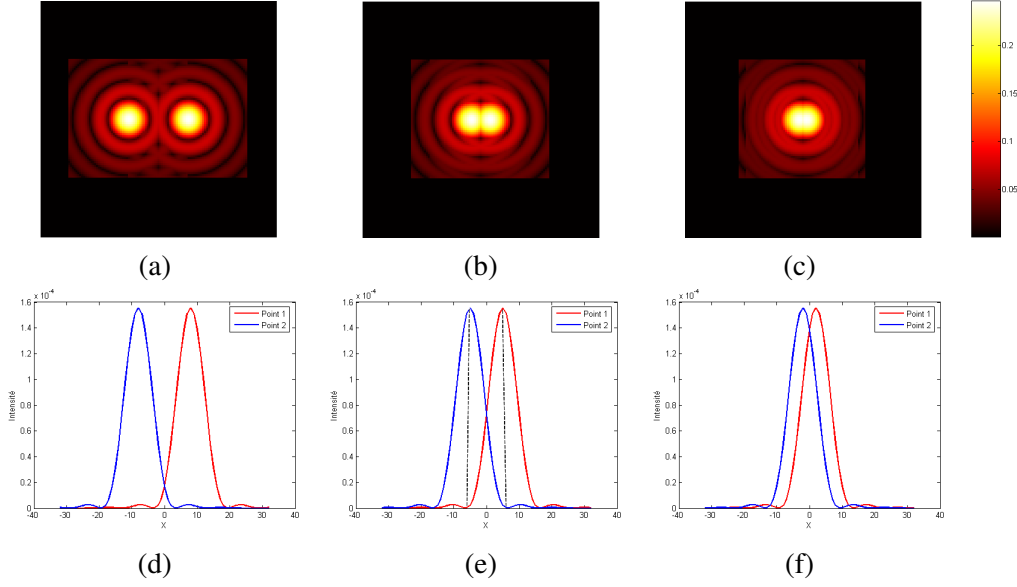


FIGURE 1.7 – La résolution est la capacité à séparer deux points discernables vus à travers le microscope. La première ligne montre l'image de deux points vus à travers un système limité par la diffraction, la deuxième ligne montre une ligne d'intensité de l'image 2D, prise suivant l'axe ( $OX$ ). ((a) et (d)) correspondent à deux points résolus, ((b) et (e)) correspondent à deux points qui touchent la limite de résolution et ((c) et (f)) correspondent à deux points non-résolus.

La résolution axiale est donnée par la *profondeur de champ* du microscope. Cette dernière est aussi caractéristique de l'objectif. La profondeur de champ correspond à la zone de l'axe optique ( $OZ$ ), pour laquelle des points de l'axe sont simultanément focalisés (i.e. l'image de tous ces points est considérée comme nette), voir figure 1.8. Le critère de Rayleigh (dans l'espace fréquentiel) est souvent utilisé pour déterminer cette valeur. La résolution axiale dépend aussi du type de système et s'exprime comme suit [De Meyer 2008] :

- Pour un microscope conventionnel :

$$R_Z^{WFM} = \frac{2\lambda_{em}n_i}{NA^2} \quad (1.4)$$

- Pour un microscope confocal :

$$R_Z^{CLSM} = \frac{1,4\lambda_{em}n_i}{NA^2} \quad (1.5)$$

La résolution radiale est meilleure que la résolution axiale pour les deux types de systèmes à champ large et confocal. Le flou sera alors plus étalé suivant l'axe ( $OZ$ ) que suivant les axes ( $OX$ ) et ( $OY$ ).

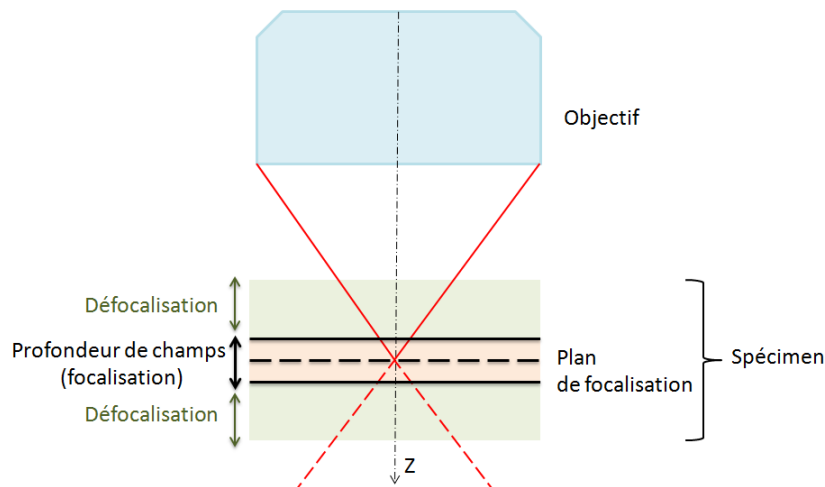


FIGURE 1.8 – Profondeur de champ : ensemble de points suivant l'axe ( $OZ$ ) qui sont simultanément focalisés.

### 1.2.1.2 Défocalisation

En microscopie optique, pour qu'une image soit nette, il faut que l'objet soit placé dans le plan focal du système optique. Lorsque celui-ci est décalé du plan focal ou a une épaisseur importante, il en résulte une image floue (voir figure 1.9).

En microscopie à champ large, étant donné que la totalité de l'échantillon est éclairée par un faisceau de lumière blanche, la lumière collectée contient la fluorescence émise par le plan focal mais aussi celle émise par les plans adjacents à celui-ci. La lumière provenant des plans non-focaux aboutit ainsi à un flou de *défocalisation*.

Le flou de défocalisation est considérablement réduit en microscopie confocale. En effet, dans ce système, l'échantillon, n'est plus éclairé par une lumière blanche mais par un pointeur laser qui balaie l'échantillon plan par plan et point par point. L'excitation n'est plus globale mais assimilable à un point. De plus, la détection se fait à travers un sténopé ("pinhole" en anglais) qui est placé dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif. Ceci permet de rejeter la lumière provenant des plans non-focaux (voir figure 1.3 (b)). Néanmoins, bien que ce sténopé réduit considérablement le flou de défocalisation, il réduit aussi le rapport signal sur bruit [Pankajakshan 2009a]. En effet, plus l'ouverture du sténopé est petite, plus la quantité de lumière transmise est faible, et plus le rapport signal sur bruit est faible. Un des moyens les plus simples pour améliorer le rapport signal sur bruit est d'allonger le temps d'acquisition et d'augmenter ainsi le nombre moyen de photons. Cependant, ceci n'est pas la meilleure solution étant donné que la fluorescence décroît avec le temps d'exposition (c'est le phénomène de *photoblanchissement*) et détruit les tissus vivants (c'est le phénomène de *phototoxicité*).

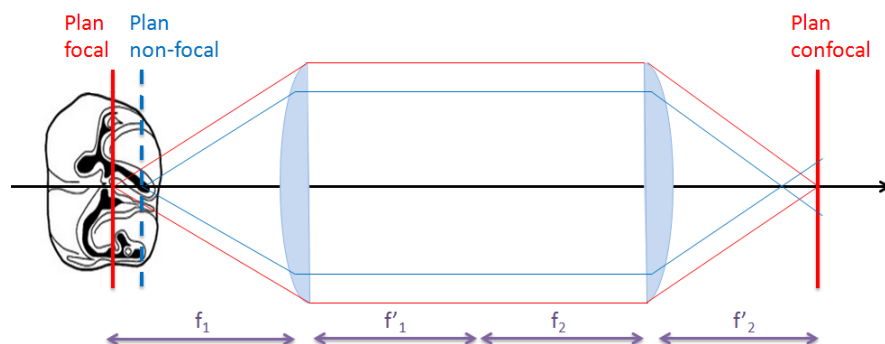


FIGURE 1.9 – Les lentilles composant l’objectif font concentrer la lumière provenant d’un point source situé dans le plan focal (en rouge) en un point unique dans le plan confocal. Cependant, l’émission de la lumière en dehors du plan de focalisation (en bleu) aboutit à un flou dans le plan de détection (plan confocal des lentilles).

### 1.2.1.3 Aberration

Il existe principalement deux types d’aberrations qui peuvent affecter la qualité d’une image microscopique : les *aberrations chromatiques* et les *aberrations géométriques*.

#### 1.2.1.3.a Aberrations chromatiques

Les aberrations chromatiques sont dues à la décomposition de la lumière blanche en plusieurs bandes de couleurs, chacune ayant une longueur d’onde différente. La lumière sera alors focalisée à différentes positions suivant la longueur d’onde de la lumière. Ce type d’aberrations est fortement réduit en microscopie confocale grâce à l’utilisation d’une lumière cohérente comme le laser, il ne reste que les aberrations chromatiques liées à la détection. En microscopie classique, lorsque une lumière blanche est utilisée, ce type d’aberration peut être corrigée dans les objectifs dites *apochromatiques*.

#### 1.2.1.3.b Aberrations géométriques

Les aberrations géométriques, appelées aussi aberrations *monochromatiques* liées à des paramètres géométriques comme l’angle d’inclinaison des rayons lumineux, sont plus importants. En particulier, les *aberrations sphériques* sont les plus prépondérantes en microscopie confocale. Ce type d’aberrations correspond à un écart entre la marche théorique des rayons lumineux (pour laquelle le système est réglé) et la marche réelle des rayons, à cause du changement des indices de réfractions entre les milieux traversés. Dans les conditions idéales i.e. en absence de tout type d’aberrations, l’image d’une onde plane incidente par une lentille idéale est une onde sphérique (cf. figure 1.10 (a)). Cependant, en présence d’aberrations, l’onde sortant du système optique est déformée et n’est plus sphérique. La surface d’onde dépend de la marche des rayons (cf. figure 1.10 (b)). Il est possible de distinguer deux types de déformations de surface d’onde :

- Déformations dues à la forme sphérique des lentilles : les rayons traversant la lentille ne se focalisent pas au même endroit à cause de la différence d'épaisseurs de la lentille au bord et au centre. Ces aberrations peuvent être réduites en utilisant des lentilles dites *asphériques*.
- Déformations dues aux changements des indices de réfraction entre les différents milieux composant le système : le milieu d'immersion de l'objectif, la lamelle et le spécimen (voir figure 1.11). Chaque milieu est caractérisé par un indice de réfraction (IR), donc par une vitesse de propagation de lumière. Lorsque la lumière traverse l'interface (nommé dioptre) entre deux milieux d'IRs différents, elle est déviée de sa trajectoire initiale. La déviation dépendra de l'angle d'incidence du rayon et du rapport entre les IRs des deux milieux. Ces aberrations s'accroissent lorsque le spécimen à imager est non-homogène (ayant différents IRs). Dans cette thèse, nous donnons une attention particulière à ce type d'aberrations dont l'impact sur la qualité d'image est discuté ci-dessous.

### 1.2.1.3.c Effets des aberrations sphériques

En microscopie de fluorescence, le milieu d'immersion est généralement choisi de sorte que son IR soit le plus proche possible de celui de la lamelle (e.g. l'huile a un IR de 1.515 proche de celui du verre). Le changement d'IRs entre ces deux milieux est alors négligeable. Le changement d'IRs entre la lamelle et le spécimen n'est généralement pas négligeable et induit les effets suivants :

- Le rayon se focalise à une position le long de l'axe ( $OZ$ ), différente de ce qu'elle devrait être dans un système idéal sans saut d'IR. La distance entre le bas de la lamelle et le point de focalisation est appelée *position de focalisation nominale* (en anglais "Nominal Focal Position (NFP)"), dans le cas d'un système idéal sans variation d'IR (cf. figure 1.11) et *position de focalisation réelle* (en anglais "Actual Focal Position (AFP)") dans le cas d'un système optique avec variation d'IRs. Le *décalage de focalisation* est la différence entre ces deux valeurs. Souvent, l'IR de milieu d'immersion  $n_i$  est plus grand que celui du spécimen  $n_s$ , ce qui implique d'après la relation de Snell-Descartes  $n_i \sin \theta_i = n_s \sin \theta_s$  que  $\theta_i \leq \theta_s$ . Cela veut dire que le plan de focalisation observée est plus proche de la lamelle que celui observé dans un système sans aberrations (cf. figure 1.11). La position de l'objet imagé va paraître plus loin de la lamelle. En revanche, si  $n_i$  est inférieur à  $n_s$ , la focalisation est plus éloignée de la lamelle que dans le cas d'un système idéal sans aberrations. La position de l'objet observé sera alors plus proche de la lamelle que sa vraie position qui correspond à un système sans aberrations.
- Le point imagé ne se trouve pas au plan de focalisation supposé, ce qui conduit à l'augmentation du flou, notamment le flou de défocalisation. De plus, pour la même raison, la lumière qui pénètre dans le sténopé (pinhole) peut être moins importante que dans un système idéal. Ceci réduit à la fois la résolution spatiale et l'intensité observée.

Des illustrations de ces phénomènes sont proposées à la section 1.4.2.

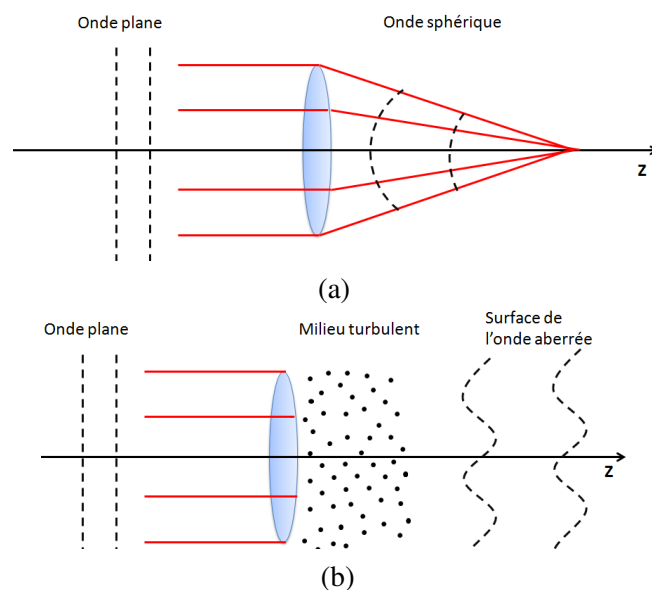


FIGURE 1.10 – L'image d'une onde plane par un système optique idéal (sans aberrations sphériques) est une onde sphérique (a). En présence d'aberrations, la surface d'onde est déformée (b).

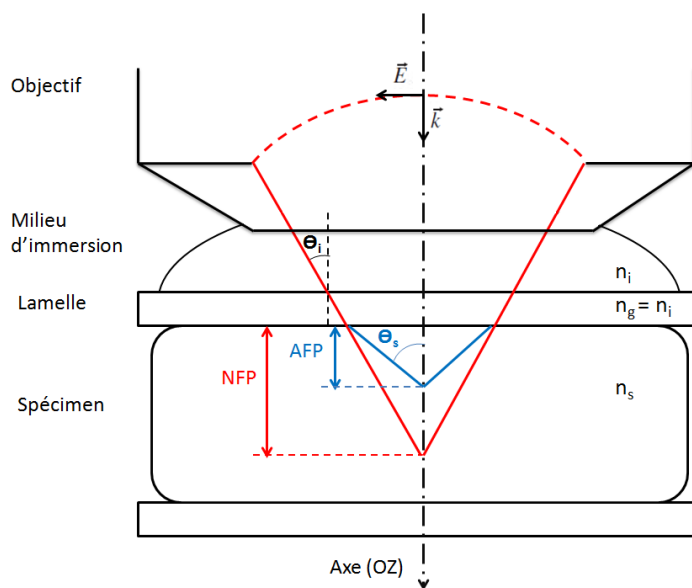


FIGURE 1.11 – Différence de marches des rayons lumineux à travers les différentes couches du système (le milieu d'immersion et la lamelle sont supposés de même IR, le spécimen a un IR différent). Le rayon en rouge, correspondant à un cas idéal sans aberrations sphériques, se focalise à une position nominale (NFP). Le rayon en bleu, correspondant aux conditions réelles, en présence d'aberrations sphériques, se focalise à une position réelle (AFP).



### 1.2.2 Bruit

En plus des déformations listées ci-dessus, les images de microscopie de fluorescence sont essentiellement contaminées par trois types de bruit : un *bruit photonique* lié à l'émission de photons, un *bruit thermique* lié à l'électronique du capteur et un *bruit de fond* lié aux interférences de photons parasites. Ces types de bruit peuvent être plus ou moins importants suivant le type de système utilisé, confocal ou à champ large.

#### 1.2.2.1 Bruit de photon

Ce bruit est intrinsèque à la nature photonique de la lumière. L'émission discrète des photons implique un processus de comptage au niveau du capteur qui suit une statistique de Poisson. Autrement dit, à partir de  $N_o$  photons émis suite à une excitation lumineuse d'un point, seulement  $N_i$  photons sont collectés au niveau du détecteur avec une probabilité distribuée suivant une loi de Poisson de moyenne et de variance  $N_o$  (i.e.  $N_i \sim \text{Poisson}(N_o)$ ). Ce type de bruit est important lorsque l'intensité de la lumière mise en oeuvre est faible. Les images de microscopie confocale sont en particulier dominées par ce type de bruit étant donné que le nombre de photons atteignant le détecteur est limité par l'ouverture du sténopé. En revanche, en microscopie à champ large, la totalité de l'échantillon est illuminée, le flux de photons qui arrive au détecteur, est alors élevé. Dans ce cas, la statistique poissonnienne tend vers une statistique gaussienne de moyenne et de variance dépendant du signal.

#### 1.2.2.2 Bruit de détecteur

Ce bruit est d'origine thermique, lié à l'électronique du capteur. Il est dû à l'agitation naturelle des électrons, qui augmente avec la température du capteur, conduisant ainsi à l'apparition d'électrons parasites au niveau du capteur. Le bruit résultant est également appelé *bruit d'obscurité*. Il est généralement modélisé par une statistique gaussienne dont la moyenne et la variance peuvent être facilement estimées par l'estimateur de Maximum de Vraisemblance (MV) [Pankajakshan 2009a]. Aujourd'hui, il existe plusieurs techniques permettant de réduire efficacement ce bruit, par exemple par refroidissement du capteur.

#### 1.2.2.3 Bruit de fond

Ce bruit est dû à la présence de photons parasites dans le système, soit par auto-fluorescence, soit par réflexion de la lumière, ou encore par diffusion des fluorescences dans l'échantillon. Ces photons parasites se superposent avec ceux provenant des fluorochromes excités, résultant ainsi en une information entachée. En effet, même dans un endroit où il n'y a aucun objet visible, il y a toujours quelque faible luminosité en raison de la diffusion de la lumière. Le bruit de fond est plus considérable dans les images de microscopie à champ large où tous les fluorochromes situés sur le trajet lumineux sont excités. Le bruit de fond est généralement approché par une constante qui peut être estimée à partir d'une région ne contenant pas de signal.

Pour conclure cette section, nous notons que d'autres types de fluctuations comme le bruit de lecture, le photoblanchissement, etc, peuvent apparaître dans les images de microscopie de fluorescence. Nous nous limitons dans ce travail aux types de distorsions décrites dans cette section.

### 1.3 Formulation mathématique

Après avoir identifié les différentes sources de dégradation en microscopie de fluorescence, nous en donnons dans cette section la modélisation mathématique couramment adoptée dans la littérature. Nous montrons sur la figure 1.12 un schéma simple de la chaîne de dégradation d'image que nous formulons par une expression mathématique. Pour ce faire, nous introduisons dans le paragraphe suivant quelques notations mathématiques.

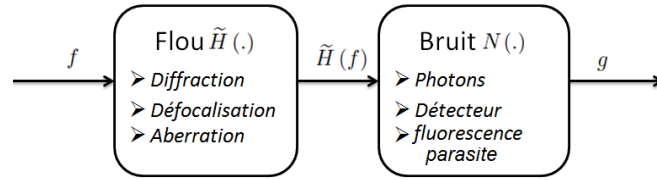


FIGURE 1.12 – Chaîne de dégradation d'image en microscopie de fluorescence.

#### 1.3.1 Notations mathématiques

Soient les notations suivantes :

- $\mathcal{O}$  un ensemble borné de  $\mathbb{R}^3$ , qui désigne l'espace objet, celui-ci correspond au support de l'objet avant dégradation.
- $\mathcal{I}$  un ensemble borné de  $\mathbb{R}^3$ , qui désigne l'espace image, celui-ci correspond au support de l'image recueillie au niveau du détecteur.
- $f \in \mathcal{L}^1(\mathcal{O}, \mathbb{R}^+)$  représente l'image originale. Celle-ci correspond à la fluorescence de l'objet ou le nombre de photons qui partent de l'objet.
- $\tilde{H} : \mathcal{L}^1(\mathcal{O}, \mathbb{R}^+) \rightarrow \mathcal{L}^1(\mathcal{I}, \mathbb{R}^+)$  un opérateur qui modélise les dégradations de l'optique (i.e. le flou essentiellement),
- $q \in \mathcal{L}^1(\mathcal{I}, \mathbb{R}^+)$  est l'image dégradée par l'optique avant discrétisation. Celle-ci est l'image de  $f$  par l'opérateur  $\tilde{H}$  i.e.  $q = \tilde{H}(f)$ .
- $\mathcal{I}^d$  un ensemble borné de  $\mathbb{N}^3$ , qui désigne l'espace image discrétisé. Celui-ci correspond au support de l'image discrète formée au niveau du détecteur.
- $q^d : \mathcal{I}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  est une version discrétisée de l'image floue  $q$ . En effet, les données enregistrées au niveau du capteur sont échantillonnées : l'intensité est enregistrée pour un nombre fini de points de l'espace image. Pour chaque voxel  $i \in \mathcal{I}^d$ , l'intensité enregistrée au niveau du capteur correspond au nombre de photons dans un volume élémentaire  $V_i$  i.e.  $q^d(i) = \int_{V_i} q(u) du = \int_{V_i} \tilde{H}(f) du, \forall i \in \mathcal{I}^d$ .
- $g : \mathcal{I}^d \rightarrow \mathbb{N}$  est l'image floue et bruitée formée au niveau du capteur. Celle-ci suit une statistique de bruit que l'on note par  $N(\cdot)$  qui dépend des intensités de  $q^d$  i.e.

$$g \sim N(q^d).$$

Nous explicitons dans ce qui suit l'opérateur de flou  $\tilde{H}$  et la statistique de bruit  $N(\cdot)$ , ce qui nous permet d'écrire le modèle de dégradation final.

### 1.3.2 Modèle de flou

La fonction d'étalement de point ("Point Spread Function (PSF)" en anglais) ou réponse impulsionnelle est la réponse du système optique à une distribution d'intensité ponctuelle (distribution de Dirac) dans le volume de l'objet. Elle modélise toutes les distorsions que subit le front d'onde en provenance d'un point source dans l'objet, après avoir traversé les différentes couches du système optique. Nous notons par  $\tilde{h}(u, u')$ , la réponse du système à une impulsion placée au point  $u' = (x', y', z')$  dans le volume de l'objet  $\mathcal{O}$ , exprimé en un point  $u = (x, y, z)$  dans l'espace du détecteur  $\mathcal{I}$ . Elle est positive et normalisée :

$$\begin{aligned} \tilde{h} : \mathcal{I} \times \mathcal{O} &\rightarrow \mathbb{R}^+ \\ (u, u') &\mapsto \tilde{h}(u, u') \end{aligned} \quad (1.6)$$

$$\int_{\mathcal{I}} \tilde{h}(u, u') du = 1, \forall u' \in \mathcal{O} \quad (1.7)$$

À cause des aberrations optiques, la PSF varie suivant la position du point source dans le domaine objet (ceci sera illustré dans le paragraphe 1.4.2). L'image floue  $q$  dépendra de toutes ces PSFs ainsi que de l'intensité de l'image originale :

$$q(u) = \tilde{H}(f)(u) = \int_{\mathcal{O}} \tilde{h}(u, u') \cdot f(u') du' \quad (1.8)$$

Lorsque les indices de réfraction varient en strates ou en couches planes, la PSF varient uniquement en profondeur (un exemple de système à deux couches est : le milieu d'immersion a un IR similaire à celle de la lamelle et le spécimen est homogène avec un IR différent). L'expression (1.8) s'écrit :

$$\begin{aligned} q(x, y, z) &= \int_{\mathcal{O}} \tilde{h}(x, y, z, x', y', z') \cdot f(x', y', z) dx' dy' dz' \\ &= \int_{\mathcal{O}} \tilde{h}(x - x', y - y', z, z') \cdot f(x', y', z) dx' dy' dz' \end{aligned} \quad (1.9)$$

Comme la PSF est invariable suivant les axes  $(OX)$  et  $(OY)$ , la dégradation par  $\tilde{H}$  revient à calculer de multiples convolutions bidimensionnelles. Ces convolutions doivent être calculées pour chaque  $z'$  et  $z$ , les coordonnées axiales des espaces objet et image respectivement. Le calcul de cette opération est coûteux en temps de calcul (la complexité de calcul est de l'ordre de  $O(n_z^2 n_x n_y \log(n_x n_y))$ ). C'est pourquoi dans de nombreux travaux, la PSF est supposée stationnaire i.e. la PSF ne dépend pas des coordonnées objet. La relation précédente s'écrit alors sous forme d'un produit de convolution.

Dans un produit de convolution, l'image  $f$  et la PSF stationnaire  $h$  sont supposées définies sur  $\mathbb{R}^3$  afin de pouvoir utiliser la propriété de la transformée de Fourier (TF) (voir

l'équation (1.11)). Le produit de convolution de  $f$  et  $h$  s'écrit alors comme suit :

$$\begin{aligned} H(f)(u) &= \int_{\mathbb{R}^3} h(u-u') \cdot f(u') du' \\ &= \int_{\mathbb{R}^3} h(u') \cdot f(u-u') du' \end{aligned} \quad (1.10)$$

avec  $H$  l'opérateur de flou stationnaire. L'avantage du produit de convolution est de réduire considérablement la complexité de calcul. En effet, le produit de convolution devient une simple multiplication point à point dans l'espace de Fourier :

$$TF(H(f))(k) = TF(h)(k) \cdot TF(f)(k) \quad (1.11)$$

où  $k \in \mathbb{R}^3$  sont les coordonnées tridimensionnelles dans l'espace de Fourier et  $TF(f)$  désigne la transformée de Fourier de  $f$  et se calcule comme suit :

$$TF(f)(k) = \int_{\mathbb{R}^3} f(u) \cdot e^{-jku} du \quad (1.12)$$

avec  $j$  le nombre complexe tel que  $j = \sqrt{-1}$ .

### 1.3.2.1 Notations discrètes

Comme les observations sont discrètes, l'image que l'on cherche à reconstruire numériquement est aussi discrète et de même taille que l'image observée. En effet, nous considérons l'approximation suivante : les volumes  $S_i$  étant de même taille ( $|V_i| = 1, \forall i \in \mathcal{J}^d$ ), nous avons :

$$q^d(i) = \int_{V_i} q(u) du = |V_i| q(i) = q(i), \forall i \in \mathcal{J}^d \quad (1.13)$$

Nous introduisons les notations suivantes en discret :

- $f : \mathcal{J}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  la version discrète de  $f$ ,
- $\tilde{h} : \mathcal{J}^d \times \mathcal{J}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  la version discrète de la PSF spatialement variable  $\tilde{h}$ ,
- $h : \mathcal{J}^d \rightarrow \mathbb{R}^+$  la version discrète de la PSF spatialement invariable  $h$ ,
- $\tilde{H}(\cdot)$  l'opérateur de flou spatialement variable défini pour des fonctions à variables discrètes ( $\tilde{H}(f) = \sum_{i' \in \mathbb{N}^3} \tilde{h}(i, i') \cdot f(i'), i \in \mathcal{J}^d$ ),
- $H(\cdot)$  l'opérateur de flou spatialement invariable défini pour des fonctions à variables discrètes ( $H(f) = \sum_{i' \in \mathbb{N}^3} \tilde{h}(i - i') \cdot f(i'), i \in \mathcal{J}^d$ ).

En discret, il est parfois plus commode d'exprimer le produit de convolution sous forme d'une multiplication matrice-vecteur. Les voxels de l'image discrète sont rangées, en suivant l'ordre lexicographique, dans un vecteur que l'on note par  $\mathbf{f} \in \mathbb{R}^n$ , avec  $n$  la taille de l'image. Les coefficients de la PSF sont rangés dans une matrice de taille  $n \times n$  que l'on note par  $\mathbf{H}$ . Elle est circulante par blocs circulants par blocs circulants (dû à la dimension 3). La convolution circulaire est alors calculée par la multiplication matrice-vecteur suivante  $\mathbf{H}\mathbf{f}$ . Les rôles peuvent être inversés et la convolution circulaire peut être modélisée

comme suit  $\mathbf{F}\mathbf{h}$  où  $\mathbf{F} \in \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^n$  est une matrice qui représente la convolution par l'image  $\mathbf{f}$  et  $\mathbf{h} \in \mathbb{R}^n$  est un vecteur qui représente la PSF.

Dans le cas d'un flou spatialement variable comme donné par l'équation (1.8) en continu, l'opération de dégradation peut également être exprimée en discret par une multiplication matrice-vecteur  $\tilde{\mathbf{H}}\mathbf{f}$ , la matrice  $\tilde{\mathbf{H}}$ , contenant les coefficients des différentes PSFs, n'est pas forcément circulante.

Nous considérons dans ce travail, le cas d'un flou variable en profondeur comme donné par l'équation (1.9). Nous proposons dans le chapitre suivant une approximation de cette opération de dégradation afin de réduire le coût calculatoire et en vue de réduire le nombre de variables inconnues lors de l'estimation de la PSF.

### 1.3.3 Modèle de bruit

Nous définissons ici le modèle de bruit que nous considérons dans cette thèse. Comme nous l'avons vu dans la sous-section 1.2.2, il existe essentiellement trois types de bruit qui peuvent entacher l'imagerie de microscopie de fluorescence : le bruit photonique, le bruit de détecteur et le bruit de fond.

Le bruit photonique (cf. paragraphe 1.2.2.1), dû à la nature photonique de la lumière, est inévitable et modélisé par une statistique de Poisson. Concernant le bruit de détecteur (cf. paragraphe 1.2.2.2), il est souvent supposé blanc gaussien de moyenne nulle et de variance identique sur tous les pixels. Le bruit de détecteur peut être aisément atténué par un pré-réglage du détecteur et par sa maintenance à une température adéquate pour l'acquisition. C'est pourquoi, nous ne le prenons pas en compte dans notre modélisation. Des modèles de bruit plus élaborés comme un mélange de bruit gaussien-poissonien sont présentés par exemple dans [Paul 2010, Luisier 2011]. L'estimation des paramètres d'un tel modèle a fait l'objectif de nombreux travaux, nous citons par exemple [Jezierska 2011] où une méthode fondée sur l'algorithme d'Espérance-Maximisation a été développée. Un modèle plus complet adéquat pour la simulation de bruit en microscopie confocale, incluant toute la chaîne de distorsion (y compris le bruit d'échantillonnage, de quantifications, etc), est présenté dans [Herberich 2012a].

Le bruit de fond (cf. paragraphe 1.2.2.3), supposé homogène et invariable dans tout le volume, est approché par une constante  $b_g > 0$  de faible valeur. Cette constante peut être facilement estimée à partir d'une région ne contenant pas l'objet (en prenant simplement la moyenne des voxels dans cette région).

Ainsi, le processus d'acquisition de chaque voxel  $i \in \mathcal{I}^d$  suit une loi de Poisson de paramètre  $q_i^d + b_g$ .

**Définition 1.** On dit que la variable aléatoire  $X$  suit une loi de Poisson de paramètre  $\lambda$  et on écrit  $X \sim \mathcal{P}(\lambda)$ , lorsque les valeurs de  $X$  sont les entiers naturels  $a$  et la loi de probabilité de  $X$  est définie par :

$$Pr(X = a) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^a}{a!} \quad (1.14)$$

Les observations  $g(i)$ ,  $i \in \mathcal{I}^d$  représentent un nombre de photons et sont donc dans  $\mathbb{N}$ .  $g(i)$  est une réalisation d'un processus de Poisson de moyenne et variance  $q_i^d + b_g$  :

$$\begin{aligned} g(i) &\sim \mathcal{P}(q_i^d + b_g) \\ &\sim \mathcal{P}\left(\int_{V_i} \tilde{H}(f)(u) du + b_g\right) \end{aligned} \quad (1.15)$$

La probabilité conditionnelle de  $g(i)$  s'écrit alors comme suit :

$$Pr\left(g(i) / \int_{V_i} \tilde{H}(f)(u) du + b_g\right) = \frac{\left(\int_{V_i} \tilde{H}(f)(u) du + b_g\right)^{g(i)} e^{-\left(\int_{V_i} \tilde{H}(f)(u) du + b_g\right)}}{g(i)!} \quad (1.16)$$

Étant donné que les observations  $g(i)$  sont indépendantes deux à deux, la probabilité jointe conditionnelle s'écrit :

$$\begin{aligned} Pr(g/f, \tilde{H}) &= \prod_{i \in \mathcal{I}^d} Pr\left(g(i) / \int_{V_i} \tilde{H}(f)(u) du + b_g\right) \\ &= \prod_{i \in \mathcal{I}^d} \frac{\left(\int_{V_i} \tilde{H}(f)(u) du + b_g\right)^{g(i)} e^{-\left(\int_{V_i} \tilde{H}(f)(u) du + b_g\right)}}{g(i)!} \end{aligned} \quad (1.17)$$

En discret, l'équation ci-dessus s'écrit comme suit :

$$Pr(g/f, \tilde{H}) = \prod_{i \in \mathcal{I}^d} \frac{\left(\tilde{H}(f)(i) + b_g\right)^{g(i)} e^{-\left(\tilde{H}(f)(i) + b_g\right)}}{g(i)!} \quad (1.18)$$

## 1.4 Modélisation de la PSF

Nous nous intéressons maintenant à la modélisation de la PSF. La mesure de la PSF est possible en pratique [Cole 2011], en observant des billes fluorescentes qui ont une taille proche de la limite de résolution du système, jouant le rôle de d'un Dirac. Cependant, cette mesure est limitée, car le signal est généralement très faible par rapport au bruit. On préfère donc parfois utiliser un modèle permettant le calcul théorique de la PSF. Si l'avantage de ce modèle est l'absence de bruit, son défaut est de ne pas prendre en compte la nature souvent très complexe du système d'acquisition. Il existe plusieurs modèles de PSF théoriques qui ont été établis dans la littérature en se basant sur l'optique géométrique. Ils diffèrent principalement dans la précision qu'ils offrent et dans le coût calculatoire. Ils peuvent être divisés en deux familles :

- les *modèles vectoriels* tels que [Richards 1959, Török 1995, Haeberle 2004], prenant en compte la polarisation de la lumière, sont les plus précis et les plus coûteux en termes de temps de calcul.

- les *modèles scalaires* tels que [Hopkins 1955, Stokseth 1969, Gibson 1989, Born 2003], ayant une représentation relativement simple, sont moins précis et plus rapides à calculer.

La seconde famille est plus utilisée par la communauté puisqu'elle présente un coût calculatoire relativement faible pour une précision proche de celle de la première famille.

Historiquement, l'étude de ces modèles a commencé dans les années cinquante [Hopkins 1955, Born 1959]. Les premiers modèles ne prennent pas en compte les aberrations dues aux changements d'IRs entre les différents milieux du système [Gibson 1989, Hopkins 1955]. Récemment, ces aberrations ont été introduites où seules les changements d'IRs entre trois milieux plans (i.e. le milieu d'immersion, la lamelle et le spécimen qui est supposé homogène) sont considérés [Friskén Gibson 1991, Booth 1998]. L'étude autour de ce sujet a ensuite progressé en proposant une modélisation des aberrations dans un spécimen hétérogène (ayant un IR variable) [Hiware 2011]. Une bonne précision de modélisation a été obtenue par une technique dite de *tracé de rayon* [Sharma 1982, KAM 2000, Kam 2001]. L'idée est de calculer la trajectoire du rayon lumineux depuis l'illumination jusqu'à la détection au niveau du capteur. Néanmoins, la mise en place de cette technique nécessite la connaissance de l'IR en tout point de l'objet, ce qui est aujourd'hui irréalisable en pratique. Par ailleurs, même si la distribution d'IR de l'objet est disponible, le calcul du tracé des rayons est très complexe et dépend de la géométrie de l'objet.

Nous utilisons un modèle scalaire se basant sur l'approximation de Stokseth [Stokseth 1969] pour la génération de PSFs et la simulation d'image floue de microscopie de fluorescence. Un terme d'aberration lié aux variations d'IRs [Booth 1998] est ajouté à ce modèle comme décrit dans [Pankajakshan 2009a]. L'avantage de ce modèle est qu'il offre une précision de modélisation proche de celle des modèles vectoriels pour un temps de calcul relativement faible. Nous notons dans la suite par  $h^t$  la PSF calculée par un tel modèle, soient  $h^t_{WFM}$  pour un système à champ large et  $h^t_{CLSM}$  pour un système confocal. Nous étudions ensuite le comportement de la PSF en fonction des aberrations. Étant donné que le modèle théorique présente certaines limitations comme la dépendance de plusieurs paramètres inaccessibles en pratique, et la lenteur de calcul, nous proposons de l'approcher par une fonction gaussienne donnée par quelques paramètres (trois ou quatre). Nous étudions cette approximation en présence des aberrations sphériques.

#### 1.4.1 Modèle de Stokseth

Les microscopes de fluorescence sont caractérisés par deux types de déformations : déformation de la lumière d'illumination et déformation de la lumière de détection. La PSF d'intensité arrivant sur le détecteur s'écrit [Egner 2006] :

$$h^t(x, y, z) \propto |h_{ill}(x, y, z)|^2 |h_{det}(x, y, z)|^2, \quad (1.19)$$

où  $h_{ill}(x, y, z) \in \mathbb{C}$  appelée *PSF cohérente d'illumination*, correspond à l'amplitude de l'onde d'illumination et  $h_{det}(x, y, z) \in \mathbb{C}$  appelée *PSF cohérente de détection*, est l'amplitude de l'onde de détection.

Dans le microscope à champ large, tous les points de l'objet sont éclairés simultanément par une lumière blanche. L'amplitude de l'onde d'illumination  $h_{ill}$  est alors supposée constante d'après la théorie établie dans [Born 1999]. La PSF d'un microscope à champ large peut alors s'écrire comme suit [Born 1999, Egner 2006] :

$$h_{WFM}^t(x, y, z) \propto |h_{det}(x, y, z)|^2 \quad (1.20)$$

Dans le microscope confocal, un sténopé est utilisé afin de limiter la lumière hors-focalisation. La PSF d'un microscope confocal est alors exprimée comme suit :

$$h_{CLSM}^t(x, y, z) \propto |h_{ill}(x, y, z)|^2 (D(x, y) * |h_{det}(x, y, z)|^2) \quad (1.21)$$

où  $D(x, y)$  est une fonction qui caractérise l'ouverture du sténopé. Elle tend vers une distribution de Dirac pour des faibles ouvertures du sténopé (autour de  $1AU^1$ ). La PSF se simplifie alors comme suit :

$$h_{CLSM}^t(x, y, z) \propto |h_{ill}(x, y, z)|^2 |h_{det}(x, y, z)|^2 \quad (1.22)$$

Lorsque les longueurs d'onde d'illumination et de détection sont assez proches,  $h_{ill}$  et  $h_{det}$  peuvent être supposées égales, il s'ensuit alors  $|h_{ill}(x, y, z)|^2 \simeq |h_{det}(x, y, z)|^2$  [Egner 2006]. L'expression ci-dessus de la PSF du microscope confocal devient :

$$h_{CLSM}^t(x, y, z) \propto |h_{ill}(x, y, z)|^4 \simeq |h_{det}(x, y, z)|^4 \quad (1.23)$$

#### 1.4.1.1 Expression de la PSF cohérente

Notons par  $h_A$  la PSF cohérente associée à une longueur d'onde donnée  $\lambda$  (celle-ci correspond à  $h_{ill}$  pour une illumination et à  $h_{det}$  pour une détection). On a donc :

$$h_{WFM}^t(x, y, z) \propto |h_A(x, y, z)|^2 \quad (1.24)$$

$$h_{CLSM}^t(x, y, z) \propto |h_A(x, y, z)|^4 \quad (1.25)$$

L'étude présentée dans [Stokseth 1969] montre que celle-ci peut être calculée à partir de la transformée de Fourier inverse d'une fonction que l'on notera par  $P(\cdot)$ , dite *fonction pupille*. Cette dernière correspond à l'amplitude et la phase du front d'onde produit par un point source à la sortie de l'objectif [Stokseth 1969] :

$$\begin{aligned} h_A(x, y, z) &= TF_{2D}^{-1}(P(k_x, k_y, z)) \\ &= \int_{k_y} \int_{k_x} P(k_x, k_y, z) \exp(j(k_x x + k_y y)) dk_x dk_y \end{aligned} \quad (1.26)$$

---

1. AU : Airy Unit en anglais. C'est une unité de mesure de diamètre du sténopé (pinhole) en microscopie confocale. Elle correspond au diamètre du disque d'Airy du microscope. Sa valeur diffère suivant les propriétés du système considéré. Elle s'exprime en fonction de la longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{ex}$ , et de l'ouverture numérique  $NA$  du système comme suit :  $1AU = \frac{1.22 \lambda_{ex}}{NA} nm$



où  $(x, y, z) \in \mathbb{R}^3$  et  $(k_x, k_y, k_z) \in \mathbb{R}^3$  sont respectivement les coordonnées spatiales et fréquentielles. La fonction pupille  $P(k_x, k_y, z)$  décrit alors les différentes turbulences affectant le front d'onde en traversant les interfaces du système optique. Elle est exprimée en fonction de la coordonnée  $z$  correspondant à la position du plan de focalisation :

$$P(k_x, k_y, z) = A(\theta_i) \exp(jk_0 \varphi(\theta_i, \theta_s, z)) \chi_C(k_x, k_y) \quad (1.27)$$

avec

- $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$  le nombre d'onde de la lumière se propageant dans le vide,
- $\theta_s$  l'angle que fait le rayon lumineux se propageant dans le spécimen avec l'axe optique ( $OZ$ ),
- $\theta_i$  l'angle que fait le rayon lumineux propageant dans le milieu d'immersion avec l'axe optique ( $OZ$ ) (cf. figure 1.11). Ce dernier est inférieur à l'angle d'incidence maximal  $\theta_{max}$  donné par l'ouverture numérique de l'objectif ( $\theta_i < \theta_{max}$ ), cf. figure 1.5. L'angle  $\theta_i$  est lié aux coordonnées fréquentielles  $k_x$  et  $k_y$  par la relation  $\theta_i = \arcsin\left(\frac{\sqrt{k_x^2 + k_y^2}}{k_i}\right)$ , avec  $k_i = \frac{2\pi n_i}{\lambda_i}$  le nombre d'onde de la lumière se propageant dans le milieu d'IR  $n_i$ .
- $A(\theta_i)$  est une fonction dite *fonction d'apodisation* de l'objectif qui s'exprime comme suit :

$$A(\theta_i) = \begin{cases} \sqrt{\cos(\theta_i)} & \text{pour une illumination} \\ \frac{1}{\sqrt{\cos(\theta_i)}} & \text{pour une détection} \end{cases} \quad (1.28)$$

- $\chi_C$  est une fonction indicatrice qui représentent la quantité de lumière qui rentre dans l'objectif :

$$\chi_C(k_x, k_y) = \begin{cases} 1 & \text{Si } (k_x, k_y) \in C \\ 0 & \text{Sinon} \end{cases} \quad (1.29)$$

avec  $C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{R}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < k_0 NA\}$  le support de la fonction pupille (limité par l'ouverture numérique de l'objectif).

- $\varphi(\theta_i, \theta_s, z)$  est une phase modélisant les différents types de distorsions que subit le front d'onde en traversant le système. Elle est décomposée en deux termes [Pankajakshan 2009a] :

$$\varphi(\theta_i, \theta_s, z) = \varphi_d(\theta_i, z) + \varphi_a(\theta_i, \theta_s) \quad (1.30)$$

Le premier terme  $\varphi_d(\theta_i, z)$  est lié au phénomène de défocalisation expliquée dans le paragraphe 1.2.1.2 et le second terme  $\varphi_a(\theta_i, \theta_s)$  est lié aux aberrations sphériques expliquées dans le paragraphe 1.2.1.3. La fonction indicatrice (équation (1.27)) traduit la quantité de lumière qui rentre dans l'objectif. Nous donnons dans ce qui suit l'expression de chacun de ces termes.

### 1.4.1.2 Phase de défocalisation

D'après [Stokseth 1969], l'expression de  $\varphi_d(\theta_i, z)$  est donnée par :

$$\varphi_d(\theta_i, z) = n_i \left( \sqrt{t^2 + 2tz + (z \cos \theta_i)^2} - tz \cos \theta_i \right) \quad (1.31)$$

où  $t$  est la distance entre l'objectif et un point image.

En effectuant un développement limité, il est montré que pour des faibles valeurs de  $\theta_i$ , l'expression ci-dessus se simplifie comme suit :

$$\varphi_d(\theta_i, z) \simeq n_i z (1 - \cos \theta_i), \theta_i \ll 1 \quad (1.32)$$

### 1.4.1.3 Phase d'aberrations

Cette phase modélise la différence de chemins optiques entre les conditions idéales supposées par le constructeur, et les conditions réelles d'observation. L'expression de la phase d'aberration a été établie dans [Booth 1998, Jacobsen 2011, Egner 2006] pour un système optique à deux couches : le milieu d'immersion a un IR que l'on note par  $n_i$ , et le spécimen a un IR que l'on note par  $n_s$ . Elle est exprimée comme suit :

$$\varphi_a(\theta_i, \theta_s) = d (n_s \cos \theta_s - n_i \cos \theta_i) \quad (1.33)$$

où  $d$  est la distance de focalisation nominale. Cette expression peut s'étendre facilement à un système à  $K$  couches :

$$\varphi_a(\theta_1, \dots, \theta_K, d_2, \dots, d_K) = \sum_{k=1}^{K-1} d_{k+1} (n_{k+1} \cos \theta_{k+1} - n_k \cos \theta_k) \quad (1.34)$$

où  $n_k, \theta_k, d_k, k \in \{1, \dots, K\}$  sont respectivement l'IR, l'angle de propagation, et l'épaisseur du  $k^{\text{ème}}$  milieu. Nous étudions dans le paragraphe suivant l'impact des aberrations sphériques sur la PSF dans le cas d'un système à deux couches.

**Remarque 1.** Une autre formulation de la PSF théorique, largement utilisée dans la littérature, est celle proposée par Born et Wolf [Born 1959]. Elle a été modifiée par Gibson et Lanni pour inclure les aberrations sphériques [Friskén Gibson 1991]. Dans cette formulation, la PSF cohérente s'écrit comme suit :

$$h_A(x, y, z) = \frac{B}{z} \int_0^1 J_0 \left( k_0 a \rho \frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{z} \right) \exp(jW(\rho)) \rho d\rho \quad (1.35)$$

avec  $B$  une constante,  $\rho = \sqrt{k_x^2 + k_y^2}$ ,  $a$  une constante qui correspond au rayon de l'ouverture de l'objectif (exprimé dans le plan focal arrière),  $J_0(\cdot)$  la fonction de Bessel de première espèce et d'ordre zero, et  $W(\rho)$  la phase d'aberration. La comparaison de cette formulation avec celle de Stokseth est présentée dans [Gibson 1989]. La principale différence entre ces deux formulations est que dans la formulation de Born et Wolf, la focalisation sur un plan  $Z$  se fait par le déplacement du détecteur, l'objet étant fixé, tandis que

**Cadre 1 Résumé du modèle théorique de PSF**

- En microscopie à champ large :  $h_{WFM}^t(x, y, z) \propto |h_A(x, y, z)|^2$ .
- En microscopie confocale :  $h_{CLSM}^t(x, y, z) \propto |h_A(x, y, z)|^4$ .

avec :

$$\begin{aligned}
 h_A(x, y, z) &= \int_{k_y} \int_{k_x} P(k_x, k_y, z) \exp(j(k_x x + k_y y)) dk_x dk_y, \\
 P(k_x, k_y, z) &= A(\theta_i) \exp(jk_0 \varphi_d(\theta_i, z) + \varphi_a(\theta_i, \theta_s)) \chi_C(k_x, k_y), \\
 \varphi_d(\theta_i, z) &\simeq n_i z (1 - \cos \theta_i), \\
 \varphi_a(\theta_i, \theta_s) &= d(n_s \cos \theta_s - n_i \cos \theta_i), \\
 \chi_C(k_x, k_y) &= \begin{cases} 1 & \text{Si } (k_x, k_y) \in C \\ 0 & \text{Sinon} \end{cases}, \text{ avec } C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{R}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < k_0 NA\}.
 \end{aligned}$$

la formulation de Stokseth correspond à un microscope avec un détecteur fixe et un objet en mouvement. Le mouvement de l'objet donne à la variation de la distance entre l'objet et la lamelle, ce qui aboutit à une expression de PSF différente de celle de la modélisation de Born et Wolf où cette distance est invariable. Ceci est démontré dans [Gibson 1989]. Le second type de système est plus fréquemment rencontré en microscopie 3D. Notons que dans certains autres types de système, le déplacement en Z se fait par le mouvement de l'objectif, ce qui résulte en les déplacements relatifs de l'objet et du détecteur.

**1.4.2 Étude des PSFs avec aberrations**

Afin de pouvoir pallier le phénomène d'aberration, il est important de comprendre son impact sur la PSF. Pour ce faire, nous étudions ici la variation de la PSF en fonction des aberrations. Nous considérons deux cas :

- un système optique paraxial avec une ouverture numérique de 0.6,
- un système optique non-paraxial avec une ouverture numérique de 1.4.

Nous générons pour ces deux types de système des PSFs à différentes profondeurs entre  $0\mu m$  et  $60\mu m$ . L'excitation et l'émission sont supposées à des longueurs d'onde respectives de  $\lambda_{ex} = 560nm$ ,  $\lambda_{em} = 600nm$ . Les pas d'échantillonnage latéral et axial sont respectivement  $50nm$  et  $150nm$ . Ces valeurs des pas sont choisies par le critère de Nyquist [Pankajakshan 2009a]. Comme le flou est plus important en Z qu'en (X, Y), le pas d'échantillonnage axial est plus grand que le pas d'échantillonnage radial. L'objectif, supposé d'un grossissement de 100X, est plongé dans l'huile d'IR 1.515. L'IR du spécimen est supposé le même dans tout le volume de l'objet mais de valeur variable entre 1.33 et 1.515 suivant le test considéré afin de simuler de fortes ou de faibles aberrations. Par exemple, dans le premier test, nous avons considéré une valeur de 1.33 pour simuler de fortes aberrations. Pour cette configuration, nous avons calculé par le modèle présenté dans 1.4.1 les PSFs à différentes profondeurs. Pour chacune des PSFs, nous avons mesuré les valeurs suivantes : le décalage de focalisation suivant l'axe (OZ) (i.e. la différence entre l'AFP

et la NFP), l'intensité maximale, la largeur à mi-hauteur (LMH) suivant l'axe ( $OZ$ ) et la largeur à mi-hauteur suivant l'axe ( $OX$ ). Ces valeurs sont présentées dans la table 1.1 pour le système non-paraxial et dans la table 1.2 pour le système paraxial. D'après ces tables, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Dans le cas non-paraxial, lorsque l'on augmente la profondeur, l'intensité maximale de la PSF décroît, le décalage de focalisation en  $Z$  augmente en valeur absolue, et la largeur à mi-hauteur (radiale et axiale) de la PSF augmente également.
- Dans le cas paraxial, seule le décalage de focalisation augmente en valeur absolue avec la profondeur, les largeurs à mi-hauteur et l'intensité maximale sont pratiquement inchangées. Notons aussi que la variation du décalage de focalisation dans le cas paraxial est moins important que dans le cas non-paraxial. Par exemple à  $60\mu m$  de profondeur, le décalage en valeur absolue est de  $2.25\mu m$  dans le cas non-paraxial tandis qu'il ne dépasse pas  $0.9\mu m$  dans le cas paraxial.

Afin de mieux illustrer ces conclusions, nous présentons dans la figure 1.14 les profils d'intensité des PSFs à différentes profondeurs suivant l'axe ( $OZ$ ) pour les deux systèmes paraxial et non-paraxial. Par ailleurs, dans le cas non-paraxial, nous pouvons remarquer sur la figure 1.14 (a), l'apparition de petites lobes à gauche du lobe principal pour les PSF calculées à une grande profondeur, ce qui induit une dissymétrie axiale de la PSF. Pour mieux voir cela, nous montrons dans la figure 1.13, des coupes axiales et radiales présentées à une échelle logarithmique de deux PSFs d'un système non-paraxial : la première PSF présentée dans la figure 1.13 (a) est calculée à une profondeur nulle et la deuxième PSF présentée dans la figure 1.13 (b) est calculée à une profondeur de  $10\mu m$ . Ces images montrent que la première PSF est bien symétrique par rapport à la NFP (les coupes radiales sont pratiquement les mêmes au dessus et au dessous de la NFP). Cependant ceci n'est pas le cas pour la deuxième PSF (voir figure 1.13 (b)). De plus, pour mieux comprendre le comportement

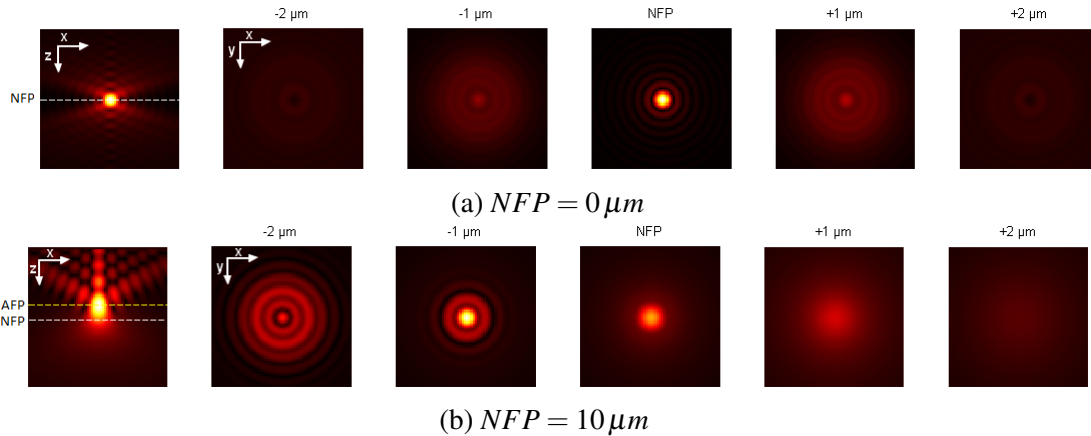


FIGURE 1.13 – Influence de la variation d'IR sur la PSF : Coupes ( $X, Z$ ) (présentée dans la première colonne à gauche) et ( $X, Y$ ) (présentées dans les autres colonnes) de deux PSFs calculées respectivement à des profondeurs de  $0\mu m$  (a) et  $10\mu m$  (b). Les images sont présentées à une échelle logarithmique.

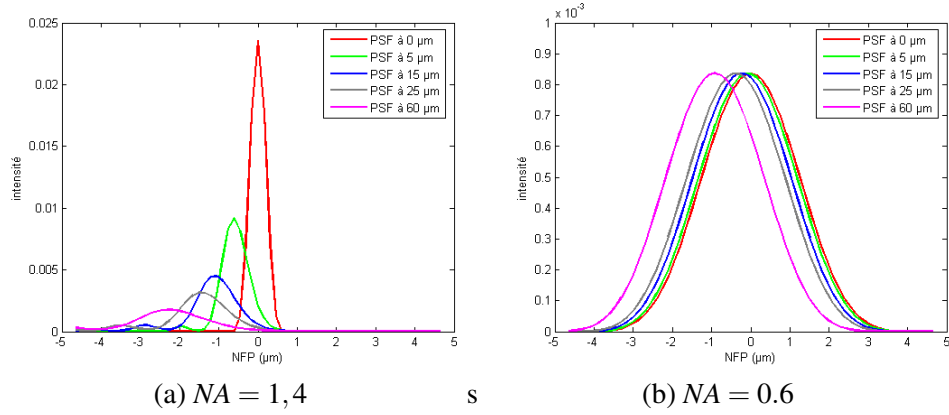


FIGURE 1.14 – Profils d'intensité suivant l'axe ( $OZ$ ) des PSFs calculées à différentes profondeurs :  $0\text{ nm}$ ,  $5\text{ nm}$ ,  $15\text{ nm}$ ,  $25\text{ nm}$  et  $60\text{ nm}$  pour deux systèmes ayant respectivement une ouverture numérique de (a)  $NA = 1,4$  et (b)  $NA = 0,6$ .

de la réponse impulsionnelle en fonction des aberrations, nous avons tracé dans les figures 1.15 et 1.16 le décalage de focalisation en  $Z$  et le maximum d'intensité en fonction de la profondeur nominale  $NFP$  pour des valeurs de  $n_s$  variant entre 1.33 et 1.5. Nous pouvons remarquer que le décalage de focalisation est d'autant plus important que la variation d'IR est élevée. Quant au maximum d'intensité, il décroît plus ou moins rapidement suivant la variation d'IR. Cependant, il est quasiment constant pour le système paraxial, même pour les grandes variations d'IR. En outre, nous comparons la PSF affectée par les aberrations

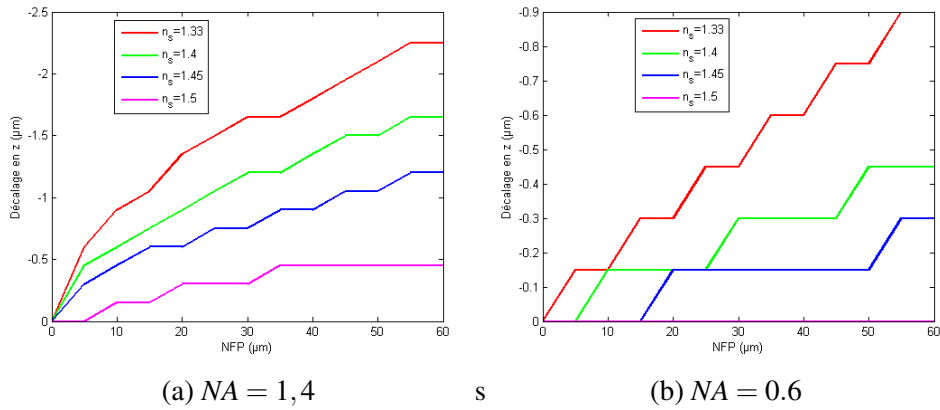


FIGURE 1.15 – Variation du décalage de focalisation axiale (en  $\mu m$ ) en fonction de la profondeur nominale  $NFP$  (en  $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont tracées pour un système non-paraxial (a) et un système paraxial (b).

sphériques (à une profondeur non-nulle) avec celle non-aberrée (à une profondeur nulle). En effet, dans certains des travaux précédents, par exemple dans [Pankajakshan 2009a] où le spécimen est supposé non-épais, la PSF est supposée la même dans tout le volume

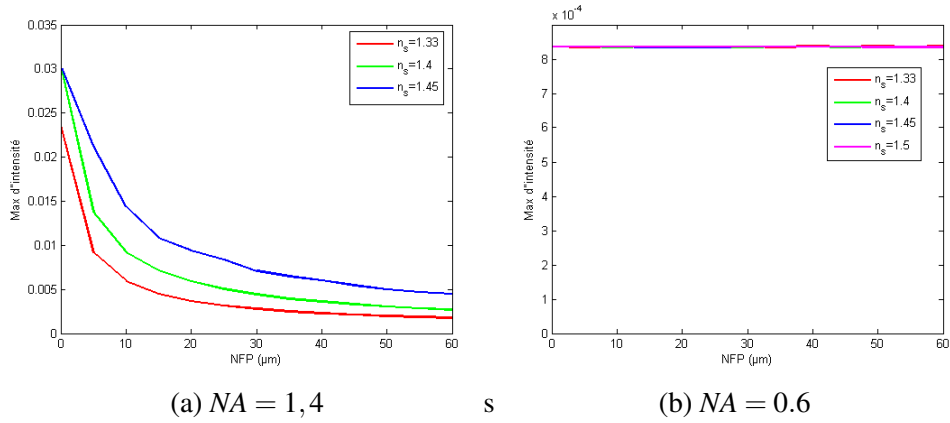


FIGURE 1.16 – Variation de l'intensité maximale de la PSF en fonction de la profondeur nominale NFP (en  $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e. l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont tracées pour un système non-paraxial (a) et un système paraxial (b).

NFP ( $\mu m$ )	Décalage en $z$ ( $\mu m$ )	Max d'intensité ( $\times 10^{-3}$ )	LMH en $z$ ( $\mu m$ )	LMH en $(x, y)$ ( $\mu m$ )
0	0	23,577	0,45	0,15
10	-0,30	5,979	0,90	0,25
20	-0,45	3,672	1,20	0,35
30	-0,55	2,771	1,35	0,35
40	-0,60	2,280	1,65	0,35
60	-2.25	1,767	1.95	0.35

TABLE 1.1 – Variation des propriétés de la PSF en fonction de la profondeur nominale pour un système non-paraxial  $NA = 1,4$ .

NFP ( $\mu m$ )	Décalage en $z$ ( $\mu m$ )	Max d'intensité ( $\times 10^{-3}$ )	LMH en $z$ ( $\mu m$ )	LMH en $(x, y)$ ( $\mu m$ )
0	0	0,836	2,85	0.35
10	-0.15	0,836	2,85	0.35
20	-0.3	0,835	2,85	0.35
30	-0.45	0,835	2,85	0.35
40	-0.6	0,836	3,00	0.35
60	-0.9	0,836	3,00	0.35

TABLE 1.2 – Variation des propriétés de la PSF en fonction de la profondeur nominale pour un système paraxial ( $NA = 0,6$ ).

de l'objet, souvent celle juste au dessous de la lamelle est considérée. Il est alors important d'évaluer l'erreur engendrée par une telle approximation. Dans la figure 1.17 nous présentons la variation de cette erreur en fonction de la profondeur pour différentes variations d'IR. Nous remarquons qu'elle croît rapidement avec la profondeur, notamment dans le cas non-paraxial où l'erreur se stabilise à une valeur maximale. Cette stabilisation de l'erreur s'explique par le fait que le lobe principal des PSFs profondes est totalement décalé par rapport à celui de la PSF à  $0\mu m$  de profondeur, qui se trouve centrée, ce qui aboutit à une erreur de 100%. Pour comparer uniquement la forme des PSFs (le décalage étant ignoré), nous présentons dans la figure 1.18, l'erreur obtenue pour des PSFs profondes recentrées i.e. recalées sur la PSF à  $0\mu m$  de profondeur. Nous remarquons que l'erreur décroît de plus que 25 % pour le système non-paraxial (cf. figure 1.18(a)). Cette erreur devient quasiment nulle pour le système paraxial (cf. figure 1.18(b)). Ainsi, dans le cas paraxial, la forme de la PSF est invariante en profondeur, uniquement le décalage de focalisation qui augmente en profondeur.

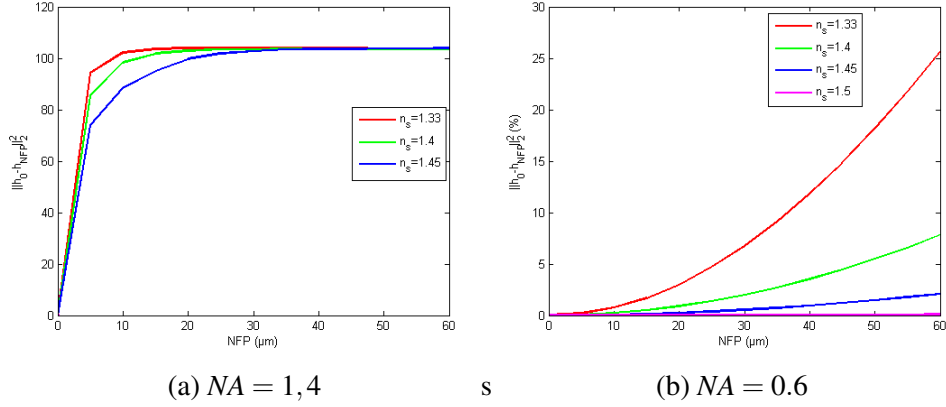


FIGURE 1.17 – Variation de l'erreur quadratique entre la PSF immédiatement au dessous de la lamelle  $h_0$  (à une profondeur nulle) et la PSF  $h_{NFP}$  à une profondeur donnée entre  $0\mu m$  et  $60\mu m$  en fonction de la profondeur nominale NFP (en  $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e. l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont montrées pour un système non-paraxial (a) et un système paraxial (b).

### 1.4.3 Approximation gaussienne de la PSF

Bien que le modèle de génération de PSF présenté dans la sous-section 1.4.1 soit efficace pour la modélisation des différentes déformations introduites par le système, il reste coûteux en terme de temps calcul (nécessite le calcul de  $n_z$  transformées de Fourier en 2D dont la complexité de calcul est de l'ordre de  $O(n_x n_y \log(n_x n_y))$  où  $n_x$ ,  $n_y$ , et  $n_z$  représentent le nombre de pixels suivant chacune des dimensions) et peu pratique pour résoudre le problème de restauration. En effet, il dépend des paramètres physiques du système qui sont difficiles à ajuster pour des spécimens inconnus (e.g. l'IR du spécimen et la profondeur du point imagé). En effet, une très petite erreur dans la calibration des IRs (de l'ordre

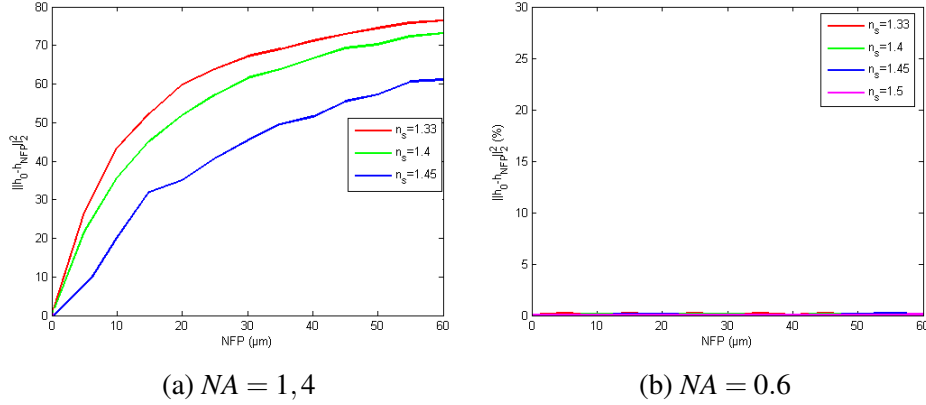


FIGURE 1.18 – Variation de l'erreur quadratique entre la PSF à une profondeur nulle  $h_0$  et la PSF à une profondeur donnée  $h_{NFP}$  recentrée, en fonction de la profondeur nominale NFP (en  $\mu m$ ) pour différentes variations d'IR i.e. l'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, nous avons fait varier l'IR du spécimen entre 1.33 et 1.515. Les courbes sont montrées pour un système non-paraxial.

de 0.01) entraîne une grande perturbation de la PSF.

Récemment, un modèle de PSF gaussien a été étudié pour un système sans aberrations sphériques [Zhang 2007]. Les avantages de ce modèle sont nombreux : tout d'abord, il est très rapide à calculer par rapport au modèle théorique. Ensuite, il ne dépend que de deux paramètres (ceci est important pour résoudre le problème de restauration aveugle que l'on abordera dans le chapitre 3). Enfin, il assure certaines propriétés importantes de la PSF comme la positivité et la normalisation (ceci sera discuté en détail dans le chapitre suivant). Nous proposons ici de reprendre ce modèle, présenter certains résultats d'approximation dans le cas d'un système sans aberrations sphériques et étudier son extension au cas d'un système avec aberrations sphériques.

#### 1.4.3.1 Approximation gaussienne en absence d'aberrations

Dans [Zhang 2007], une fonction gaussienne donnée par l'équation suivante a été proposée pour l'approximation de la PSF en CLSM :

$$h^G_{\theta}(x, y, z) = \frac{1}{c(\sigma_r, \sigma_z)} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x^2 + y^2}{\sigma_r^2} + \frac{z^2}{\sigma_z^2} \right)}, \quad \forall (x, y, z) \in \mathcal{J} \subset \mathbb{R}^3 \quad (1.36)$$

où  $c(\sigma_r, \sigma_z) \in \mathbb{R}_+$  est une constante de normalisation,  $\mathcal{J}$  est un ensemble borné de  $\mathbb{R}^3$ , et  $\theta = (\sigma_r, \sigma_z)$  sont les paramètres de la gaussienne.  $\sigma_r$  et  $\sigma_z$  sont les écarts types de la gaussienne représentant respectivement l'étalement latéral et axial de la PSF.

La comparaison de ce modèle à la PSF théorique présenté au paragraphe 1.4.1 a montré que si les PSFs sont normalisées au sens de la norme  $L^\infty$  (i.e.  $\|h^t\|_\infty = \max_{(x,y,z) \in \mathcal{J}} h^t(x,y,z) = 1$ , et  $\|h^G_\theta\|_\infty = \max_{(x,y,z) \in \mathcal{J}} h^G_\theta(x,y,z) = 1$ ), nous obtenons une bonne ap-



proximation [Zhang 2007]. En effet, comme la PSF théorique d'un système sans aberrations est maximale à l'origine, cette normalisation impose la correspondance de son maximum d'intensité avec celui de la PSF gaussienne, ce qui permet d'obtenir une bonne modélisation. Les expériences présentées dans [Zhang 2007] ont montré que l'erreur d'approximation (en comparaison avec le modèle théorique) ne dépasse pas 2.2% dans le cas non-paraxial et 1.6% dans le cas paraxial pour une taille standard de l'ouverture du sténopé (de l'ordre de 1 AU).

Néanmoins, lorsque les PSFs ne sont pas normalisées au sens de la norme  $L^\infty$ , en particulier lorsqu'elles sont normalisées au sens de la norme  $L^1$  (i.e.  $\|h'\|_1 = \int_{\mathcal{J}} |h'(x, y, z)| dx dy dz = 1$ , et  $\|h_\theta^G\|_1 = \int_{\mathcal{J}} |h_\theta^G(x, y, z)| dx dy dz = 1$ ), les maxima d'intensité ne se correspondent plus, ce qui aboutit à une mauvaise approximation. La normalisation de la PSF au sens de la norme  $L^1$  est importante car elle signifie la conservation de flux de photons par l'optique (nous discutons ceci davantage dans le chapitre suivant). Nous cherchons alors à améliorer cette approximation (en faisant correspondre les maxima d'intensité de la PSF théorique et de la PSF gaussienne) tout en assurant la normalisation au sens de la norme  $L^1$ . Nous proposons d'ajouter une constante  $\varepsilon > 0$  à la fonction gaussienne, qui permet de mettre le pic de celle-ci au même niveau que le pic de la PSF théorique. Cette constante correspond en pratique aux faibles intensités autour du lobe principal qui ne sont pas modélisées par la fonction gaussienne. L'équation de la fonction d'approximation proposée est la suivante :

$$h_\theta^G(x, y, z) = \frac{1}{c(\sigma_r, \sigma_z, \varepsilon)} \left[ e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x^2+y^2}{\sigma_r^2} + \frac{z^2}{\sigma_z^2} \right)} + \varepsilon \right], \forall (x, y, z) \in \mathcal{J} \subset \mathbb{R}^3 \quad (1.37)$$

$$\text{avec } c(\sigma_r, \sigma_z, \varepsilon) = \int_{\mathcal{J}} \left[ e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x^2+y^2}{\sigma_r^2} + \frac{z^2}{\sigma_z^2} \right)} + \varepsilon \right] dx dy dz \text{ et } \theta = (\sigma_r, \sigma_z, \varepsilon).$$

Nous évaluons l'efficacité de cette approximation par des tests numériques. Considérons les deux systèmes confocaux (paraxial et non-paraxial) dont les paramètres sont donnés comme dans le paragraphe précédent. Pour chacun des systèmes, nous avons généré une PSF par le modèle théorique, la phase d'aberration étant mise à zéro (en choisissant une profondeur nulle). Nous avons ensuite estimé la PSF gaussienne la plus proche de la PSF théorique en minimisant l'erreur quadratique suivante :

$$\hat{\theta} = \text{Arg Min}_{\theta} \|h_\theta^G - h'\|_2^2 \quad (1.38)$$

Étant donné que l'erreur à optimiser n'est pas convexe par rapport aux variables  $\theta = (\sigma_r, \sigma_z, \varepsilon)$ , nous avons utilisé un algorithme de recuit simulé [van Laarhoven 1987] pour l'optimisation. Nous montrons dans les figures 1.19 et 1.20 ces résultats de comparaisons de PSFs en échelle logarithmique ainsi que leurs profils d'intensités suivant les axes (OX) et (OZ) dans la figure 1.21. Ces figures confirment l'efficacité du modèle gaussien pour un microscope confocal sans aberrations sphériques.

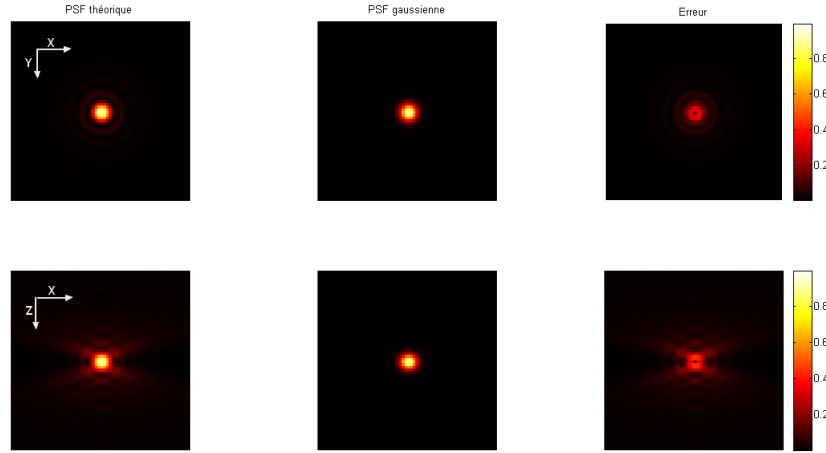


FIGURE 1.19 – Approximation gaussienne de la PSF d'un système non-paraxial sans aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 1,4 : la première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes  $(X, Y)$  et  $(X, Z)$ , en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 3.5%.

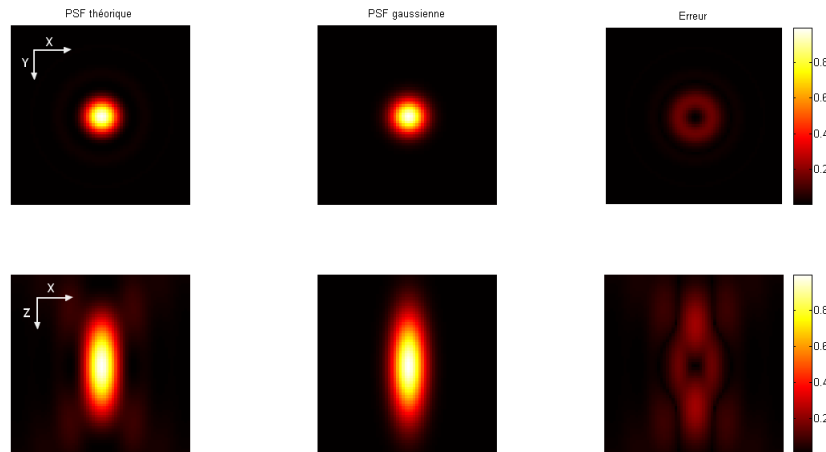


FIGURE 1.20 – Approximation gaussienne de la PSF d'un système paraxial sans aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 0,6 : la première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes  $(X, Y)$  et  $(X, Z)$ , en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 0.8%.

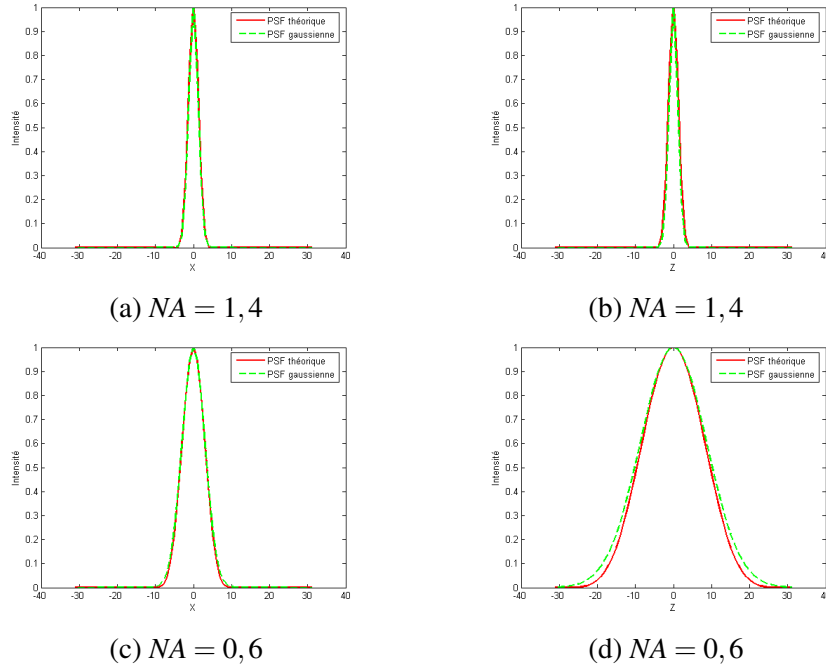


FIGURE 1.21 – Approximation gaussienne de la PSF d'un système sans aberrations sphériques dans les deux cas paraxial et non-paraxial : profils d'intensité suivant l'axe ( $OX$ ) (gauche) et suivant l'axe ( $OZ$ ) (droite) de la PSF théorique (en rouge) et de la PSF gaussienne (en vert) pour un système non-paraxial sans aberration sphérique (première ligne (a) et (b)) et pour un système paraxial sans aberration sphérique (deuxième ligne (c) et (d)).

#### 1.4.3.2 Approximation gaussienne en présence d'aberrations

Maintenant, nous cherchons à étendre l'approximation gaussienne aux cas d'un système affecté par les aberrations sphériques. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.4.2, la PSF d'un tel système subit certaines déformations de forme et des variations de position. Étant donné les propriétés de symétrie d'une fonction gaussienne, les déformations géométriques de la PSF aberrée ne sont pas prises en compte par une telle modélisation. Seul le lobe principal est modélisé, les faibles rebonds entourant celui-ci étant négligés. Quant au décalage suivant l'axe  $z$ , il est modélisé en introduisant un paramètre  $\mu_z$  comme suit :

$$h^G_{\theta}(x, y, z) = \frac{1}{c(\sigma_r, \sigma_z, \varepsilon, \mu_z)} \left[ e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x^2 + y^2}{\sigma_r^2} + \frac{(z - \mu_z)^2}{\sigma_z^2} \right)} + \varepsilon \right], \quad \forall (x, y, z) \in \mathcal{J} \subset \mathbb{R}^3 \quad (1.39)$$

avec  $c(\sigma_r, \sigma_z, \varepsilon, \mu_z) = \int_{\mathcal{J}} \left[ e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x^2 + y^2}{\sigma_r^2} + \frac{(z - \mu_z)^2}{\sigma_z^2} \right)} + \varepsilon \right] dx dy dz$  et  $\theta = (\sigma_r, \sigma_z, \varepsilon, \mu_z)$  les paramètres de la PSF.

Nous estimons maintenant l'erreur qui découle d'une telle approximation. Pour ce faire, nous considérons les mêmes conditions d'acquisition que précédemment : deux systèmes

de microscopie confocale ayant respectivement des ouvertures numériques de 0.6 et 1.4. Pour chacun des systèmes, nous avons généré par le modèle théorique des PSFs à des profondeurs entre  $0\ \mu\text{m}$  et  $60\ \mu\text{m}$ . En effet, l'épaisseur maximale qui peut être imagée est limitée par les propriétés de l'objectif et ne dépasse pas  $60\ \mu\text{m}$  pour des microscopes standards utilisés par les biologistes. Nous avons ensuite estimé la PSF gaussienne la plus proche de la PSF théorique en minimisant par un algorithme de recuit simulé l'erreur quadratique (1.38). Des coupes axiales des PSFs théoriques, de leurs approximations gaussiennes, ainsi que des erreurs obtenues sont présentées en échelle logarithmique dans les figures 1.22 et 1.23. Afin de mieux comparer ces deux modèles, nous montrons les courbes des profils d'intensités suivant les axes ( $OX$ ) et ( $OZ$ ) dans les figures 1.24. D'après ces résultats, nous remarquons que dans le cas paraxial, nous obtenons une très bonne approximation avec une erreur inférieure à 1% même pour des échantillons épais de  $60\ \mu\text{m}$  d'épaisseur, tandis que dans le cas non-paraxial, l'erreur d'approximation est plus importante mais ne dépasse pas 15%. Nous verrons dans le troisième chapitre de ce manuscrit, qu'une telle erreur n'a pas trop d'impact sur la qualité de restauration tant que le lobe principal de la PSF est bien modélisé.

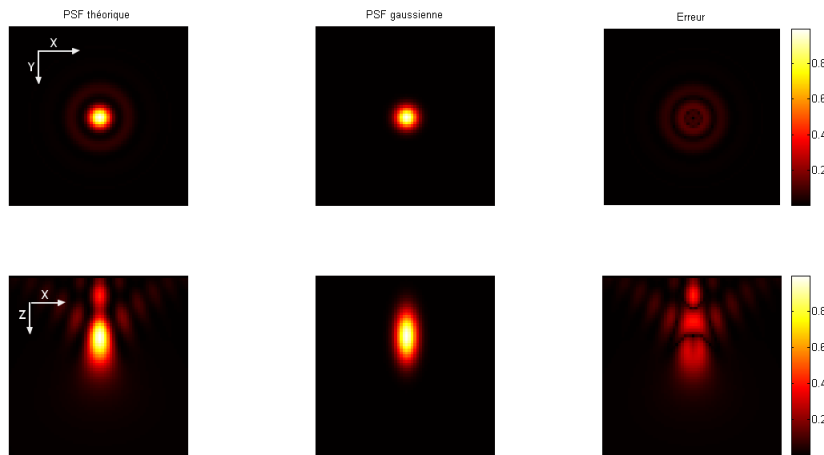


FIGURE 1.22 – Approximation gaussienne de la PSF d'un système non-paraxial avec aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 1,4 : la première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes ( $X, Y$ ) et ( $X, Z$ ), en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 8.74%, les paramètres de la PSF gaussienne estimée sont  $\hat{\sigma}_r = 95$ ,  $\hat{\sigma}_z = 640$ ,  $\hat{\mu}_z = -1650$ .

## 1.5 Amélioration de la résolution : solutions matérielles

Afin de s'affranchir de la limite de la résolution en microscopie photonique, diverses méthodes ont été proposées. Avant de se focaliser sur les méthodes numériques qui consti-

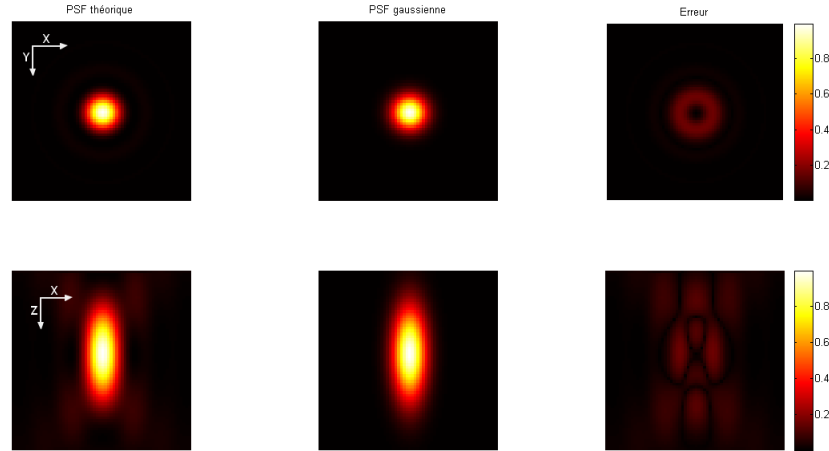


FIGURE 1.23 – Approximation gaussienne de la PSF d'un système paraxial avec aberration sphérique ayant une ouverture numérique de 0,6 : La première ligne et la deuxième ligne montrent respectivement des coupes  $(X, Y)$  et  $(X, Z)$ , en échelle logarithmique, de la PSF théorique (gauche), la PSF gaussienne (milieu), et l'erreur d'approximation (droite). L'erreur quadratique relative sur tout le volume de la PSF est de l'ordre de 0.35%, les paramètres de la PSF gaussienne estimée sont  $\hat{\sigma}_r = 148$ ,  $\hat{\sigma}_z = 1210$ ,  $\hat{\mu}_z = -450$ .

tuent l'objectif de cette thèse, nous citons ici quelques unes de ces techniques.

- La microscopie STED ("stimulated-emission-depletion" en anglais ou déplétion par émission stimulée) s'appuie sur les propriétés quantiques de la fluorescence afin d'autoriser ou interdire l'émission de fluorescence dans des zones spécifiques et diminuer ainsi la taille de la réponse impulsionnelle. Le dispositif expérimental est formé de deux lasers impulsionnels synchronisés. Le premier est utilisé pour l'excitation produisant ainsi un point focal limité par la diffraction. Le deuxième est utilisé pour éteindre la fluorescence provenant hors de la zone d'intérêt.
- La microscopie biphotonique (et multiphotonique) tire profit du phénomène d'absorption quasi-simultanée de deux photons : au lieu d'exciter la molécule par un seul photon à une longueur d'onde  $\lambda$ , celle-ci est excitée par deux photons avec une longueur d'onde  $\frac{\lambda}{2}$ . Ceci permet d'avoir une fluorescence restreinte uniquement au point focal. En plus de l'amélioration de la résolution spatiale, la microscopie à deux photons possède plusieurs autres avantages comme la possibilité d'imager des tissus épais (jusqu'à un millimètre de profondeur).
- La microscopie SPIM (Selective Plane Illumination Microscope) améliore la résolution spatiale en éliminant la lumière hors-focalisation. En effet, uniquement le plan de focalisation optique est éclairé, mais pas les autres plans du spécimen. Il n'y a donc pas d'émission de lumière hors du plan focal. Cette technique permet aussi de réduire le risque de phototoxicité au sein de l'échantillon.

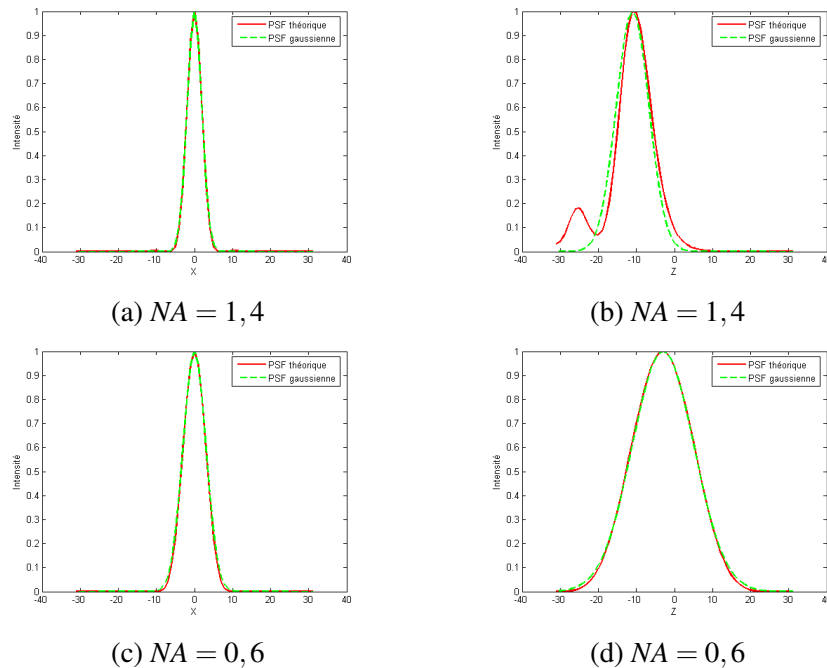


FIGURE 1.24 – Approximation gaussienne de la PSF d'un système avec aberrations sphériques, les cas paraxial et non-paraxial sont considérés : profils d'intensité suivant l'axe ( $OX$ ) (gauche) et suivant l'axe ( $OZ$ ) (droite) de la PSF théorique (en rouge) et de la PSF gaussienne (en vers) pour un système non-paraxial avec aberration sphérique (première ligne (a) et (b)) et pour un système paraxial avec aberration sphérique (deuxième ligne (c) et (d)).

- La microscopie PALM (Photo-Activation Localization Microscopy) repose sur l'utilisation de marqueurs fluorescents photo-activables, c'est-à-dire dont les propriétés de fluorescence sont contrôlées par l'utilisateur. Ceci permet de localiser des molécules individuelles en fonction de l'illumination laser utilisée.
- L'optique adaptative est une technique qui permet de corriger en temps réel les déformations évolutives et non-prédictives que subit un front d'onde plan lors de sa propagation à travers un milieu turbulent. Elle est née en astronomie en 1953 pour compenser les perturbations de l'atmosphère et n'a commencé à entrer dans les laboratoires d'imagerie biomédicale que récemment [Booth 2007]. La mise en place de cette technique nécessite essentiellement trois composants :
  - un *analyseur de front d'onde* mesure la déformation du front d'onde,
  - un *miroir déformable* effectue la correction du front d'onde,
  - un *calculateur de correction* pilote le miroir en fonction des informations issues de l'analyseur.

La correction par optique adaptative n'est que partielle car elle ne corrige que les déformations de l'ensemble du trajet de la lumière jusqu'à l'analyseur. Les aberrations de la voie d'imagerie ne sont pas vues et donc pas corrigées. Ainsi, la correction

apportée n'est pas parfaite et un post-traitement est souvent nécessaire afin de supprimer les aberrations restant présentes dans la voie d'imagerie.

La liste des méthodes pour l'amélioration de la résolution spatiale est plus longue. Chaque méthode a ces avantages et ces inconvénients. Malgré cela, la microscopie de fluorescence à champ large et confocale restent très répandues et très utilisées par les biologistes car elles sont faciles à manipuler (la préparation de l'échantillon est relativement simple) et permettent l'utilisation de nombreux fluorochromes variés, ce qui permet un large spectre d'utilisation en biologie. Il est alors intéressant de travailler sur l'amélioration numérique de la qualité de ces images.

## Conclusion

Ce chapitre nous a permis d'introduire le système de microscopie de fluorescence et d'évoquer les principales distorsions qui peuvent affecter ses images. Dans ce chapitre, nous avons défini le modèle mathématique de dégradation d'image. Le flou, étant variable en profondeur, est modélisé par une opération linéaire construite à partir de différentes PSFs, chacune associée à une coupe donnée. Pour le calcul de la PSF, nous avons présenté un modèle théorique fondé sur l'optique géométrique, qui prend en compte les différents aspects physiques contribuant à l'apparition du flou. Dans ce modèle, uniquement les aberrations sphériques découlant d'un système de variation d'IR en couches sont prises en compte. Ce modèle nous a permis d'étudier la variation de la PSF en fonction des aberrations. Nous avons montré que pour un système à deux couches, la PSF est de plus en plus étalée et décalée par rapport au plan central lorsque l'on augmente la profondeur. Nous avons également montré l'approximation de cette PSF par une fonction gaussienne permet de bien modéliser le lobe principal de la PSF. Nous nous sommes ensuite focalisés sur la modélisation de bruit et nous avons présenté un modèle poissonien vu la faible illumination en microscopie confocale, le système auquel nous nous intéressons. Enfin, nous avons présenté quelques solutions optiques permettant l'amélioration de la qualité d'image notamment en présence d'aberrations sphériques. Nous proposons dans le chapitre suivant des solutions numériques pour ce problème.





# Restauration non-aveugle

## Sommaire

<b>2.1</b>	<b>Problématique</b>	<b>42</b>
<b>2.2</b>	<b>État de l'art sur les méthodes de déconvolution : flou SI</b>	<b>43</b>
2.2.1	Méthodes déterministes	43
2.2.2	Méthodes stochastiques	51
2.2.3	Sélection du paramètre de régularisation	52
<b>2.3</b>	<b>État de l'art sur les méthodes de restauration : flou SV</b>	<b>53</b>
<b>2.4</b>	<b>Modèle de flou SV</b>	<b>54</b>
2.4.1	Première classe de modèles d'approximation du flou SV	55
2.4.2	Deuxième classe de modèles d'approximation du flou SV	55
2.4.3	Propriétés du modèle choisi	55
2.4.4	Comparaison des modèles	60
2.4.5	Forme, position et nombre de fonctions de pondération	61
<b>2.5</b>	<b>Restauration avec un opérateur de flou SV</b>	<b>65</b>
2.5.1	Restauration en présence de bruit de Poisson	67
2.5.2	Restauration en présence de bruit gaussien	75
<b>2.6</b>	<b>Comparaison sur la restauration SV</b>	<b>84</b>
2.6.1	Comparaison dans le cas d'une statistique de bruit poissonnienne	84
2.6.2	Comparaison dans le cas d'une statistique de bruit gaussienne	85

## Introduction

Après avoir identifié les différents types de dégradations qui peuvent affecter les images de microscopie de fluorescence 3D, nous nous intéressons dans ce chapitre à la restauration numérique de ces images afin de permettre aux biologistes une meilleure visualisation et interprétation des structures cellulaires. La restauration d'image est le traitement qui permet d'enlever à la fois le flou et le bruit de l'image dégradée. En absence de bruit et lorsque le flou est supposé stationnaire ou spatialement invariant (SI), la restauration revient à effectuer l'opération inverse d'une convolution : il s'agit d'une déconvolution. Lorsque le flou est spatialement variable (SV), ce qui est le cas en microscopie de fluorescence, la procédure d'inversion ne s'appelle plus une déconvolution mais une restauration (même en absence de bruit). Nous parlons d'une restauration ou d'une déconvolution non-aveugle lorsque l'opérateur de flou est connu. Le but de ce chapitre est alors de développer une

méthode de restauration non-aveugle pour l'imagerie de microscopie de fluorescence tout en prenant en compte la variabilité du flou en profondeur (suivant l'axe  $(OZ)$ ). Pour ce faire, nous étudions les modèles d'approximation du flou SV étant donné que le modèle (1.8) est prohibitif en terme de temps de calcul et nous définissons ainsi un modèle adéquat au problème d'inversion. Nous adaptons deux méthodes de déconvolution à l'opérateur de flou SV proposé : la première est effectuée dans un cadre d'un bruit multiplicatif de Poisson (ce qui correspond aux images de microscopie confocale) et la deuxième est effectuée dans un cadre d'un bruit additif gaussien (ce qui correspond aux images de microscopie à champ large). Des tests et des comparaisons sont présentés sur des images simulées et réelles de microscopie de fluorescence 3D.

Nous décomposons ce chapitre en six sections. Dans la première section, nous posons la problématique de restauration non-aveugle et nous évoquons ses principales difficultés. Dans la deuxième et troisième sections, nous présentons l'état de l'art des méthodes de restauration dans un cadre d'un flou SI, puis dans un cadre d'un flou SV. La quatrième section sera dédiée à l'étude et la comparaison des modèles d'approximation du flou SV. La cinquième section sera consacrée à la présentation de notre solution pour la restauration prenant en compte la variabilité du flou en profondeur. Nous comparons dans la dernière section notre approche à l'une des méthodes de restauration de l'état de l'art.

## 2.1 Problématique

Notre objectif est de trouver une estimée  $\hat{f}$  de l'image originale  $f$  à partir de l'observation  $g$  dégradée par un bruit additif gaussien ou multiplicatif poissonien, et un opérateur de flou  $\tilde{H}$  variable en profondeur comme donnée par l'équation (1.9). À cause des données bruitées, ce problème fait partie de la classe des *problèmes inverses mal-posés*.

**Définition 2.** La résolution d'un problème de type  $g = \tilde{H}(f)$  est dite bien posée au sens de Hadamard si les trois conditions suivantes sont vérifiées :

1. Existence d'une solution,
2. Unicité de la solution,
3. Stabilité de la solution par rapport aux données.

La première condition veut dire que toute observation  $g$  a au moins un antécédent  $f$ , ce qui veut dire que la fonction  $\tilde{H}$  est surjective. La deuxième condition d'unicité implique que  $\tilde{H}$  est une injection i.e. l'ensemble des solutions de l'équation  $\tilde{H}(f) = 0$  se réduit au singleton nul. La troisième condition de stabilité signifie qu'une faible variation sur l'observation implique une faible variation sur l'image reconstruite.

Suivant les notations introduites au premier chapitre, une formulation discrète du problème s'écrit sous la forme matricielle suivante :  $\mathbf{g} = \tilde{\mathbf{H}}\mathbf{f}$ , avec  $\tilde{\mathbf{H}} \in \mathbb{R}^{m \times n}$  la matrice associée à l'opérateur de flou linéaire,  $\mathbf{g} \in \mathbb{R}^m$  et  $\mathbf{f} \in \mathbb{R}^n$ .

Lorsque le rang  $r$  de la matrice  $\tilde{\mathbf{H}}$  vérifie  $r = m$ , il existe toujours une solution car  $\text{Im}(\tilde{\mathbf{H}}) = \mathbb{R}^m$ . Si de plus la matrice  $\tilde{\mathbf{H}}$  est carrée ( $m = n$ ),  $\tilde{\mathbf{H}}$  est injective et la solution est

alors unique. Néanmoins, cette solution est souvent instable par rapport aux données. En effet, la matrice  $\tilde{\mathbf{H}}$  peut être *mal-conditionnée*. Le mauvais conditionnement d'une matrice inversible  $\tilde{\mathbf{H}}$  se traduit par un rapport  $\frac{\|\tilde{\mathbf{H}}\|}{\|\tilde{\mathbf{H}}^{-1}\|}$  élevé. Le mauvais conditionnement amplifiera le bruit. Pour voir cela, considérons une perturbation  $\mathbf{b} \in \mathbb{R}^m$  des données :  $\mathbf{g} = \tilde{\mathbf{H}}\mathbf{f} + \mathbf{b}$ . Dans le cas où  $\tilde{\mathbf{H}}$  est carrée inversible, l'image reconstruite peut être obtenue par filtrage inverse :  $\hat{\mathbf{f}} = \mathbf{H}^{-1}(\tilde{\mathbf{H}}\mathbf{f} + \mathbf{b}) = \mathbf{f} + \tilde{\mathbf{H}}^{-1}\mathbf{b}$ . Lorsque  $\tilde{\mathbf{H}}$  est mal-conditionnée,  $\tilde{\mathbf{H}}^{-1}\mathbf{b}$  va accentuer le bruit, conduisant ainsi à une solution inacceptable. Afin de stabiliser la solution, il est alors nécessaire de régulariser le problème en contraignant la solution, soit en la forçant à appartenir à un certain ensemble, soit en lui attribuant une densité de probabilité donnée, traduisant certaines connaissances a priori sur l'objet. Ce type d'approche a donné naissance à de nombreux algorithmes que nous détaillons dans la section suivante.

Lorsque le nombre de données observées est inférieur au nombre de données à estimer (i.e.  $m < n$ ), on parle de problème *sous-déterminé*, et lorsque le nombre de données observées est supérieur au nombre de données à estimer (i.e.  $n < m$ ), on parle de problème *sur-déterminé*. L'opération  $\tilde{\mathbf{H}}$  n'est pas bijective, l'unicité n'est donc pas assurée. Dans ce travail, l'image à estimer et l'image observée sont supposées contenir le même nombre de voxels.

## 2.2 État de l'art sur les méthodes de déconvolution : flou SI

La résolution du problème de déconvolution peut se faire par différentes manières : par des approches déterministes ou stochastiques, directes ou itératives, linéaires ou non linéaires. Nous présentons ici ces différentes approches et nous proposons de les classer suivant le cadre d'estimation déterministe ou stochastique. La comparaison de quelques unes de ces méthodes en microscopie de fluorescence 3D se trouve dans [Griffa 2010a, Griffa 2010b].

### 2.2.1 Méthodes déterministes

Nous divisons les méthodes déterministes de déconvolution en deux classes, celles qui sont effectuées par une seule itération en une seule passe, et celles qui sont effectuées par des algorithmes itératifs.

#### 2.2.1.1 Méthodes directes en une seule passe

Ces méthodes sont les plus rapides et les plus simples à mettre en oeuvre. Elles permettent d'obtenir une estimée de la solution  $\hat{\mathbf{f}}$  en une seule itération souvent effectuée dans l'espace fréquentiel :

$$\hat{\mathbf{f}} = TF^{-1}[A.TF[\mathbf{g}]] \quad (2.1)$$

avec  $A$  un opérateur linéaire défini dans l'espace fréquentiel, appelé *filtre inverse fréquentiel* de  $H$ . L'inversion peut également se faire dans l'espace image, si le support de la PSF a une taille réduite. Il existe différentes méthodes permettant d'approcher le filtre

inverse  $A$ . Nous les divisons en deux catégories : les méthodes non-régularisées, et les méthodes régularisées.

#### 2.2.1.1.a Méthodes directes non-régularisées

Dans ces méthodes les plus primitives, aucune contrainte de régularité sur l'image n'est considérée. Une des méthodes triviales de cette classe consiste à choisir le filtre inverse dans Fourier suivant  $A = \frac{1}{TF[H]}$ . Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, cet opérateur amplifie le bruit, notamment si l'opérateur  $H$  est mal-conditionné (ce qui est souvent le cas). Une amélioration de cette solution est le filtre inverse généralisé qui consiste à remplacer les fréquences infinies de  $\frac{1}{TF[H]}$  par des valeurs nulles. Ceci ne résout pas le problème car ceci revient à multiplier le signal par une fonction porte dans l'espace fréquentiel, donc le convoluer par une fonction sinus cardinal (*sinc*) dans l'espace image, ce qui donnera naissance à des rebonds dans l'image reconstruite.

Une autre méthode consiste à résoudre le problème dans l'espace image en minimisant l'erreur quadratique suivante entre l'image observée  $g$  et l'image dégradée par le modèle considéré  $H(f)$  :

$$J(f) = \|g - H(f)\|^2 \quad (2.2)$$

En annulant la dérivée première de cette fonctionnelle par rapport à  $f$ , on obtient la solution suivante :

$$\hat{f} = (H^*H)^{-1} H^* g \quad (2.3)$$

Cette méthode permet d'écrire le filtre inverse dans l'espace image mais ne présente aucun avantage par rapport aux méthodes précédentes. Ce type de méthode est classé parmi les méthodes dites *linéaires* du fait que l'opérateur appliqué à  $g$  est linéaire et peut être obtenu directement en faisant annuler la dérivée première du critère considéré.

Ces techniques de déconvolution d'image ne sont que des approches assez triviales qui restent très sensibles au bruit. Nous verrons au paragraphe suivant quelques méthodes qui ont été proposées dans la littérature pour réduire cette sensibilité au bruit en introduisant une contrainte de régularité sur l'image.

#### 2.2.1.1.b Méthodes directes non-régularisées

Une des méthodes qui permet d'atténuer la sensibilité au bruit est le filtre de Wiener [Wiener 1964, Jain 1989]. L'idée de cette méthode consiste à trouver le filtre inverse  $A$  qui minimise l'erreur quadratique moyenne entre l'image vraie  $f$  et l'image estimée  $\hat{f}$  :

$$\mathbb{E}_{g|f} [\|f - \hat{f}\|_2^2] \quad (2.4)$$

L'espérance  $\mathbb{E}_{g|f}$  est calculée suivant la loi de  $g$  connaissant  $f$  (i.e. la statistique de bruit). En faisant annuler la dérivée première par rapport à  $A$  de cette expression dans l'espace fréquentiel, on obtient l'expression suivante du filtre de Wiener :

$$A = \frac{TF[H]^*}{|TF[H]|^2 + \frac{1}{SNR}} \quad (2.5)$$

où le signe  $*$  signifie l'opérateur adjoint et  $SNR$  est le rapport signal sur bruit (cf. annexe B). À partir de cette équation, on peut remarquer que cette méthode permet de réduire le bruit par rapport aux méthodes précédentes car lorsque le  $SNR$  est faible, le deuxième terme de l'équation est faible, ce qui permet d'atténuer le bruit. Cependant, quand le bruit est faible, le  $SNR$  est élevé et le filtre  $A$  tend vers  $\frac{1}{TF[H]}$ . Il est important de noter que ce filtre n'est pas trop robuste par rapport au bruit, car si  $TF[H]^*$  est nulle, le filtre  $A$  se comporte comme une fonction porte, ce qui a pour effet de produire des rebonds dans l'image reconstruite.

Une autre manière pour obtenir une solution régulière consiste à chercher une solution qui optimise un critère régularisé. C'est-à-dire, au lieu de minimiser l'erreur quadratique seule comme dans l'équation (2.2), minimiser un critère de la forme suivante :

$$J(f) = \|g - H(f)\|^2 + \alpha \|K(f)\|^2 \quad (2.6)$$

où  $\|K(f)\|^2$ ,  $K$  étant un opérateur linéaire (un dérivateur), est un terme de régularisation qui permet de lisser l'image  $f$ . Par exemple, un terme de Tikhonov de la forme  $\|\nabla(f)\|^2$  permet de pénaliser les fortes variations d'intensités entre les pixels voisins, ce qui permet d'obtenir une image régulière. Cependant, l'utilisation de la norme  $l_2$  permet de fortement pénaliser les grandes variations du gradient, ce qui aboutit à des contours lisses. Nous verrons plus loin d'autres termes de régularisation non-quadratiques qui ont été proposés dans la littérature pour contourner ce problème. Le paramètre  $\alpha$  permet de gérer le compromis entre le terme d'attache aux données (i.e. le premier terme à gauche de l'équation (2.6)) et le terme de régularisation. Nous discutons le choix de ce paramètre dans le paragraphe 2.2.3. Le critère (2.6) s'écrit facilement dans l'espace de Fourier grâce à la propriété de Parseval, ce qui permet de déduire l'expression suivante du filtre inverse fréquentiel :

$$A = \frac{TF[H]^*}{|TF[H]|^2 + \alpha |TF[K]|^2} \quad (2.7)$$

Remarquons la similarité entre ce filtre et celui de Wiener, le terme  $\alpha |TF[K]|^2$  remplaçant l'inverse du  $SNR$  dans l'équation (2.5). L'expression de ce filtre inverse est obtenue grâce à la considération d'un critère quadratique et l'utilisation des opérateurs circulants par bloc (comme la convolution ou la dérivation). Lorsque le critère n'est pas quadratique, une telle expression du filtre inverse n'est plus accessible. La mise en oeuvre des algorithmes itératifs pour l'optimisation de tel critère est alors nécessaire. Nous discutons ceci au paragraphe suivant.

Enfin, même si certaines des méthodes de cette classe présentent en quelques sortes une solution pour réduire le bruit, elles ne répondent pas aux attentes d'une bonne reconstruction car si ces méthodes aboutissent à une image régulière, elles lisent aussi les contours. Nous verrons dans le paragraphe suivant comment il est possible d'améliorer la solution par l'utilisation des fonctionnelles de régularisation non-quadratiques qui préservent les contours.

### 2.2.1.2 Méthodes itératives

À l'inverse des méthodes directes, les méthodes itératives [Biemond 1990] sont plus demandeuses en quantité de calcul car elles nécessitent l'application d'un filtre d'une

manière itérative. L'idée de ces méthodes est d'optimiser un critère résultant du maximum de vraisemblance des données (modèle directe de dégradation). L'optimisation se fait par des algorithmes itératifs, souvent basés sur une technique de descente de gradient [Nocedal 1999, Boyd 2004, Bonnans 2006]. Ces algorithmes sont souvent arrêtés après quelques itérations au bout desquelles la solution est jugée acceptable. Ceci constitue une forme de régularisation du problème et l'instant d'arrêt constitue un paramètre de cette méthode de régularisation. Deux techniques sont souvent utilisées pour fixer ce paramètre. La première consiste à arrêter l'algorithme lorsque l'erreur entre l'image estimée à une itération donnée et l'image vraie est minimale si cette dernière est connue. La deuxième consiste à arrêter l'algorithme lorsque l'erreur quadratique moyenne entre l'image observée  $g$  et  $H\hat{f}$  (où  $\hat{f}$  est l'image estimée) est égale à la variance du bruit s'il est additif gaussien.

Nous classifions ici les méthodes itératives en trois catégories : les méthodes itératives basiques (i.e. sans contraintes et non régularisées), les méthodes avec contraintes, et les méthodes régularisées.

### 2.2.1.2.a Méthodes itératives basiques

Ces méthodes cherchent à maximiser la vraisemblance de l'observation  $Pr(g|f)$ , ce qui revient à minimiser une fonction coût  $J(f)$  correspondant à l'anti-logarithme de cette vraisemblance, aucune contrainte sur la variable à estimer n'est considérée :

$$\begin{aligned}\hat{f} &= \arg \max_f Pr(g|f) \\ &= \arg \min_f -\log(Pr(g|f)) \\ &= \arg \min_f J(f)\end{aligned}$$

Une large gamme d'algorithmes a été développé pour résoudre ce type de problème, tout dépend des propriétés de la fonction coût à minimiser. Nous présentons des exemples d'algorithmes appliqués dans les cas de statistiques de bruit gaussienne et poissonienne.

**Bruit gaussien :** Dans le cas d'un bruit gaussien, la vraisemblance de l'observation s'écrit :

$$Pr(g|f) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{\|g - H(f)\|^2}{2\sigma^2}\right) \quad (2.8)$$

avec  $\sigma^2$  la variance de bruit, supposée connue. La fonction coût qui en résulte est l'erreur quadratique suivante :

$$J(f) = \|g - H(f)\|^2 \quad (2.9)$$

La minimisation de ce critère par une méthode de descente de gradient classique donne l'itération suivante qui correspond à une itération de l'algorithme de Landweber [LandwEbER 1951] :

$$\begin{aligned}\hat{f}^{k+1} &= \hat{f}^k - \delta \nabla J(\hat{f}^k) \\ &= \hat{f}^k - \delta H^* \left( g - H(\hat{f}^k) \right)\end{aligned} \quad (2.10)$$

où  $k$  est le compteur d'itération, le signe  $*$  signifie l'opération adjointe, et  $\delta$  est le pas de descente. Ce dernier doit être fixé comme suit  $\delta \leq \frac{1}{\lambda_{\max}}$  où  $\lambda_{\max}$  la valeur propre maximale de l'opérateur de convolution, afin d'assurer la convergence de l'algorithme [Bonnans 2006]. Des versions accélérées de cette méthode par la méthode de gradient conjugué et par le choix optimal d'un opérateur qui remplace  $H^*$  se trouvent dans [More 1978, Bertero 1998a].

**Bruit poissonien :** Dans le cas d'un bruit de Poisson, la vraisemblance de l'observation est donnée par l'expression suivante :

$$Pr(g|f) = \prod_{i \in \mathcal{J}^d} \frac{(H(f)(i))^{g(i)} e^{-H(f)(i)}}{g(i)!} \quad (2.11)$$

La fonction coût associée est la divergence de Kullback-Leibler qui s'écrit sous la forme suivante :

$$J(f) = \sum_{i \in \mathcal{J}^d} g(i) \log \left( \frac{g(i)}{H(f)(i)} \right) + H(f)(i) - g(i) \quad (2.12)$$

L'algorithme le plus connu pour la résolution de ce type de problème est l'algorithme MLEM pour "Maximum Likelihood Expectation- Maximization" en anglais [Dempster 1977, Shepp 1982]. Le même algorithme a été aussi introduit par Richardson-Lucy par une approche différente [Richardson 1972, Lucy 1974]. Il existe deux versions de cet algorithme i.e. une version multiplicative et une version additive. Une itération  $(k+1)$  de la version multiplicative est donnée par l'équation suivante :

$$\hat{f}^{k+1} = \hat{f}^k \cdot H^* \left( \frac{g}{H(\hat{f}^k)} \right) \quad (2.13)$$

où  $\cdot$  désigne le produit d'Hadamard (i.e. produit composante par composante). Un avantage de cet algorithme est qu'il garantit des propriétés importantes telles que la positivité ( $f(i) \geq 0, \forall i \in \mathcal{J}^d$ ) et la conservation de flux ( $\sum_{i \in \mathcal{J}^d} f(i) = c$ , avec  $c > 0$  une constante donnée) de l'image estimée. Nous verrons au paragraphe suivant quelques méthodes permettant d'imposer ces contraintes quand elles sont violées par l'algorithme d'optimisation.

### 2.2.1.2.b Méthodes avec contraintes

Afin de stabiliser la solution du maximum de vraisemblance, il est parfois utile d'incorporer des contraintes sur la variable à estimer. Ces contraintes peuvent être dans l'espace fréquentiel ou dans l'espace de l'image. Soit  $C$  un ensemble convexe traduisant des contraintes linéaires de positivité et conservation de flux. Le problème d'optimisation contraint s'écrit comme suit :

$$\hat{f} = \arg \min_{f \in C} J(f) \quad (2.14)$$

Les algorithmes les plus classiques pour la résolution de ce type de problème sont les algorithmes de *gradient projeté* [Youla 1982]. Ils consistent à simplement projeter sur l'ensemble  $C$  l'estimée obtenue par une itération  $k$  des algorithmes itératifs précédents :

$$\hat{f}^{k+1} = P_C \left( Q(\hat{f}^k) \right) \quad (2.15)$$

$P_C$  désigne la projection sur l'ensemble  $C$  et  $Q(\cdot)$  est une fonction permettant de passer d'une itération à la suivante lorsqu'il n'y a pas de contraintes comme par exemple les équations (2.10), et (2.13). Les algorithmes de gradient projeté [Bardsley 2004, Bonettini 2009] les plus avancés ne suivent pas la direction du gradient pour effectuer une descente de la fonction coût mais choisissent une autre direction  $d^k$  qui fait décroître l'énergie  $J$  tout en restant dans l'ensemble  $C$ . Par exemple, dans [Dai 2006, Bonettini 2009] la direction suivante  $d^{k+1} = P_C(Q(\hat{f}^k)) - \hat{f}^k$  est utilisée.

Une autre méthode d'optimisation sous contraintes linéaires est la méthode de *multiplicateur Lagrange* [Ng 2010, Carlván 2011] qui consiste à formuler le problème (2.14) sous la forme suivante :

$$\hat{f} = \arg \min_f J(f) + \sum_j \alpha_j \phi_j(f) \quad (2.16)$$

où  $\phi_j$  sont des fonctions décrivant les contraintes linéaires de  $C$  et  $\alpha_i > 0$  sont des paramètres dits les multiplicateurs de Lagrange. Par exemple, pour une contrainte de conservation de flux, on a  $\phi_j(f) = \sum_{i \in \mathcal{I}^d} f(i) - c$ . Nous appliquons plus tard une méthode rapide d'optimisation sous contraintes [Bonettini 2009] au problème de restauration par un opérateur de flou SV.

### 2.2.1.2.c Méthodes régularisées

Le but des méthodes de déconvolution régularisées est de stabiliser la solution par rapport au bruit en introduisant des informations a priori sur l'image. La plupart des régularisations permettent de lisser l'image reconstruite, ce qui permet d'éviter l'amplification de bruit [De Mol 1992, Bertero 1999]. L'idée générale est de définir deux termes,  $J^d(f)$  et  $J^p(f)$ . Le premier représente la fidélité de l'image  $f$  aux données  $g$ , et appelé *énergie d'attache aux données*. Celle-ci découle de la vraisemblance des données comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent :  $J^d(f) = -\text{LogPr}(g|f)$ . Le second terme représente l'*énergie de régularisation* et traduit des informations a priori que nous souhaitons imposer sur l'image  $f$ . L'estimation de  $f$  se fait en cherchant un compromis entre ces deux fonctionnelles qui se peut se formuler de différentes manières :

- La première consiste à minimiser l'énergie d'attache aux données  $J^d(f)$  en contraignant l'énergie de régularisation  $J^p(f)$  à rester inférieure à une énergie maximale  $J^p_{\max}$  :

$$\begin{aligned} \hat{f} &= \arg \min J^d(f) \\ \text{s.c. } J^p(f) &\leq J^p_{\max} \end{aligned} \quad (2.17)$$

- La deuxième consiste à minimiser l'énergie de régularisation  $J^p(f)$  en contraignant l'énergie d'attache aux données  $J^d(f)$  à rester inférieure à une énergie maximale  $J^d_{\max}$  :

$$\begin{aligned} \hat{f} &= \arg \min J^p(f) \\ \text{s.c. } J^d(f) &\leq J^d_{\max} \end{aligned} \quad (2.18)$$



- La troisième consiste à minimiser la combinaison de ces deux fonctionnelles en introduisant un paramètre  $\alpha$ , appelé *paramètre de régularisation* ou *hyperparamètre*, qui permet de pondérer l'importance de la régularisation par rapport au fidélité aux données :

$$\hat{f} = \arg \min J^d(f) + \alpha J^p(f) \quad (2.19)$$

Notons que très souvent les deux premiers problèmes (2.17) et (2.18) sont résolus avec une méthode de multiplicateur de Lagrange, ce qui les ramène sous la forme du problème (2.19).

**Termes de régularisation :** Différents termes de régularisation  $J^p(\cdot)$  ont été proposées dans la littérature pour lisser l'image. La plupart d'eux pénalisent les zones non-lisses en attribuant une grande valeur de l'énergie aux régions présentant une grande variation d'intensités (i.e. régions présentant de fortes valeurs du gradient). Nous citons ici quelques unes des fonctionnelles de régularisation convexes :

- Régularisation de Tikhonov d'ordre 0 :

$$J^p(f) = \frac{1}{2} \|f\|_2^2 \quad (2.20)$$

- Régularisation de Tikhonov d'ordre 1 [Jacquelin 2003, Dey 2006] :

$$J^p(f) = \frac{1}{2} \|\nabla f\|_2^2 \quad (2.21)$$

- Régularisation de variation totale [Rudin 1994, Bect 2004] :

$$J^p(f) = \|\nabla f\|_1 \quad (2.22)$$

- Régularisation basée sur le champ aléatoire de Markov [Zanella 2009] :

$$J^p(f) = \sum_{i \in \mathcal{I}^d} \sum_{i' \in \mathcal{V}_i} \Phi_\varepsilon \left[ \left( \frac{f(i') - f(i)}{\omega(i')} \right)^2 \right] \quad (2.23)$$

avec  $\mathcal{V}_i$  un voisinage de  $i$ ,  $\omega(i')$  un paramètre d'échelle et  $\Phi_\varepsilon(t) = \sqrt{t + \varepsilon^2}$ ,  $t \geq 0$ ,  $\varepsilon \neq 0$ .

- Régularisation par les ondelettes [Daubechies 2004, Chaux 2007, Dupé 2009] :

$$J^p(f) = \|Wf\|_1 \quad (2.24)$$

avec  $W$  un opérateur de transformée en ondelettes.

Les deux premières régularisations de Tikhonov (équations (2.20) et (2.21)) présentent l'avantage d'être différentiables, ce qui permet d'appliquer les méthodes de descente du gradient pour l'optimisation. Cependant, leur utilisation est limitée car elles lissent les contours (les forts gradients sont fortement pénalisés par l'utilisation d'une fonction quadratique) [Dey 2006]. La régularisation par la variation totale (équation (2.22)) permet

d'éviter ce problème par l'utilisation de la norme  $l_1$ . L'inconvénient de cette régularisation est qu'elle n'est pas différentiable. C'est pourquoi elle est souvent approchée par :

$$\|\nabla f\|_1 \simeq \sum_{i \in \mathcal{J}^d} \Phi_\varepsilon(|\nabla f(i)|^2) \quad (2.25)$$

afin de permettre la différentiabilité de ce type de régularisation,  $\varepsilon$  étant fixé à une très faible valeur (de l'ordre de  $10^{-8}$  comme suggéré dans [Vogel 2002, Bonettini 2009]). Ces régularisations sont un cas particulier de la quatrième régularisation basée sur les champs de Markov. L'avantage de ce cas général (équation (2.23)) est de permettre un lissage et une préservation de contour isotope selon le choix de la fonction  $\Phi_\varepsilon$  [Geman 1993]. La dernière régularisation (équation (2.24)) permet d'imposer une contrainte de parcimonie dans une base donnée (ondelettes, curvelettes, etc), ce qui permet de préserver les textures de l'image. Une liste plus exhaustive des fonctionnelles de régularisation ainsi que leur propriétés peut être trouvée dans [Jalobeanu 2001]. D'une façon générale, la plupart des fonctionnelles de régularisation s'écrivent sous la forme suivante :  $J^p(f) = \sum_{i \in \mathcal{J}^d} \Psi(|Kf(i)|^2)$  avec  $K$  un opérateur linéaire qui peut être l'opérateur de gradient ou n'importe quelle autre transformation.  $\Psi : \mathbb{R}^+ \rightarrow \mathbb{R}^+$  est une fonction pénalisante (peut être quadratique, linéaire, combinaison quadratique-linéaire, etc).

**Exemples d'algorithmes itératifs régularisés :** La plupart des algorithmes itératifs régularisés sont des variantes des algorithmes itératifs vus au paragraphe 2.2.1.2. En effet, au lieu de minimiser l'énergie associée à la vraisemblance de l'observation seule, il s'agit de minimiser l'énergie d'une vraisemblance pénalisée. Nous donnons deux exemples de ces algorithmes régularisés par un terme de variation totale appliqué pour des statistiques de bruit gaussienne et poissonienne.

- Dans le cas d'un bruit additif gaussien, le critère régularisé à minimiser s'écrit :

$$J(f) = \|g - H(f)\|^2 + \alpha \|\nabla f\|_1 \quad (2.26)$$

L'optimisation par un algorithme de descente de gradient classique nous donne la version régularisée de l'algorithme de Landweber [LAndwEbER 1951], la variation totale étant approchée par le terme (2.25) :

$$\hat{f}^{k+1} = \hat{f}^k - \delta \left[ H^* \left( g - H(\hat{f}^k) \right) - \alpha \operatorname{div} \left( \frac{\nabla f^k}{|\nabla f^k| + \varepsilon} \right) \right] \quad (2.27)$$

- Dans le cas d'un bruit multiplicatif poissonien, le critère régularisé à minimiser s'écrit :

$$J(f) = \sum_{i \in \mathcal{J}^d} g(i) \log \left( \frac{g(i)}{H(f)(i)} \right) + H(f)(i) - g(i) + \alpha \|\nabla f\|_1 \quad (2.28)$$

L'optimisation par un algorithme de descente de gradient classique nous donne la version régularisée de l'algorithme multiplicatif de Richardson-Lucy [Dey 2006]

donnée par l'équation suivante (la variation totale étant approchée par le terme (2.25)) :

$$f^{k+1} = \frac{f^k}{1 - \alpha \operatorname{div} \left( \frac{\nabla f^k}{|\nabla f^k| + \varepsilon} \right)} \cdot H^* \left( \frac{g}{H(f^k)} \right) \quad (2.29)$$

Il existe également des algorithmes itératifs régularisés avec contraintes. Nous citons par exemple [Lantéri 2002, Carlván 2011]. Ceci permet de stabiliser davantage la solution. Nous appliquons dans notre travail (cf. section 2.5) des algorithmes rapides avec contrainte, régularisé par un terme de variation totale.

Dans ces méthodes régularisées, le choix du paramètre de régularisation  $\alpha$  influe très sensiblement sur la qualité de la restauration. Il est souvent ajusté par essais/erreurs. Nous discutons dans le paragraphe 2.2.3 quelques méthodes automatiques proposées pour l'estimation de ce paramètre.

### 2.2.2 Méthodes stochastiques

Au lieu de chercher à imposer des contraintes sous forme de projection ou de régularisation en adjoignant un terme supplémentaire au terme d'attache aux données, nous pouvons travailler dans un cadre stochastique où toutes les variables du problème sont vues comme étant des variables aléatoires qui suivent des lois de probabilité bien déterminées. L'image à estimer  $f$  en particulier suit une loi de probabilité  $Pr(f)$  qui nous permet d'imposer certaines connaissances a priori sur l'image  $f$  (par exemple des contraintes de régularité). La loi de Bayes permet d'exprimer l'image originale en fonction de l'observation  $g$  comme suit :

$$\begin{aligned} Pr(f|g) &= \frac{Pr(g|f) Pr(f)}{Pr(g)} \\ &\propto Pr(g|f) Pr(f) \end{aligned}$$

Il s'agit alors de chercher l'image  $f$  la plus probable au sens de la loi  $Pr(f|g)$  ou d'une manière équivalente calculer l'estimation au sens du *maximum a posteriori* (MAP) :

$$\hat{f} = \arg \max_f Pr(f|g) \quad (2.30)$$

Les champs de Markov ont montré leur intérêt pour construire des lois de probabilité adaptées à de nombreux problèmes étant donné leur capacité à modéliser les différentes interactions entre les pixels voisins. Il s'agit de définir un système de voisinage entre les pixels, appelé *clique* que l'on note par  $c$  et de lui attribuer une énergie appelée *potentiel de clique*  $V(c)$ . On peut par exemple définir une énergie qui permet de forcer les pixels voisins à avoir des intensités proches, ce qui permet de favoriser des zones homogènes. L'énergie globale de toute l'image est la somme des énergies locales  $U(f) = \sum_{c \in \mathcal{C}} V(c)$ , où  $\mathcal{C}$  est l'ensemble de tous les cliques de  $f$ . La probabilité  $Pr(f)$  s'écrit alors sous la forme de la distribution Gibbsienne suivante :

$$Pr(f) = \frac{e^{-U(f)}}{Z}, \text{ avec } Z = \sum_{\Omega_f} e^{-U(f)} \quad (2.31)$$

avec  $\Omega_f$  l'ensemble de toutes les images  $f$  possibles. Grâce à cette forme énergétique de la distribution de probabilité, le calcul du maximum a posteriori (i.e. équation (2.30)) se ramène à la minimisation d'un critère comme dans l'équation (2.19) :

$$\begin{aligned}\hat{f} &= \arg \min_f -\log(Pr(f|g)) \\ &= \arg \min_f -[l \ll (Pr(g|f)) + \log(Pr(f))]\end{aligned}$$

L'optimisation peut alors se faire par des méthodes stochastiques telles que le recuit simulé [van Laarhoven 1987]. Ceci présente l'avantage d'obtenir un minimum global même si la fonctionnelle à minimiser est non-convexe et/ou non-différentiable. L'inconvénient de ces approches est la lenteur de calcul car elles font appel à des échantillonneurs [Metropolis 1953, Geman 1984, Green 1995] qui sont extrêmement lents à converger, notamment lorsque le support de la PSF est grand. Enfin, nous notons que ce cadre stochastique offre la possibilité d'estimer le paramètre de régularisation en même temps que l'image par des approches bayésiennes [Ichir 2006, Orioux 2009]. Nous discutons le problème d'estimation d'hyperparamètres dans le paragraphe suivant.

### 2.2.3 Sélection du paramètre de régularisation

Les méthodes d'estimation d'hyperparamètres se divisent également en deux classes : les approches déterministes et les approches stochastiques.

#### 2.2.3.1 Cadre déterministe

L'une des premières approches déterministes consiste à tracer le terme de régularisation  $J^p(\hat{f}_\alpha)$  (où  $\hat{f} = \arg \min_f J^d(f) + \alpha J^p(f)$ ) en fonction du terme d'attache aux données  $J^d(\hat{f}_\alpha)$  pour différentes valeurs de  $\alpha$ , ce qui donne une courbe en L, d'où le nom L-curve de cette méthode. La valeur de  $\alpha$  choisie est celle qui correspond à la plus grande courbure [Hansen 1992, Krawczyk-StańDo 2007].

Une autre méthode de la classe des approches déterministes est appelée *principe de divergence* ou "discrepancy principle" en anglais [Galatsanos 1992, Desbat 1995, Engl 1996]. Elle a été initialement proposée pour des images dégradées par un bruit additif blanc gaussien, le paramètre de régularisation est choisi de sorte que  $\|g - H\hat{f}\|^2 = n\sigma^2$ , où  $n$  est la taille de l'image et  $\sigma^2$  est la variance de bruit. Cette méthode a été adaptée à des images avec un bruit poissonien [Bardsley 2009, Le 2007, Zanella 2009].

Une autre approche est la méthode SURE ("Stein's Unbiased Risk Estimate") [Ramani 2008, Pesquet 2009, Ramani 2012] qui consiste à trouver le paramètre  $\alpha$  qui minimise la moyenne des erreurs quadratiques entre l'image vraie et l'image reconstruite  $\mathbb{E}[\|f - \hat{f}_\alpha\|^2]$ .

Les méthodes listées ci-dessus sont difficilement applicables à des fonctionnelles comportant plus qu'un seul paramètre de régularisation. Dans [Zhu 2010], une mesure de qualité sans référence a été proposée pour évaluer la qualité d'une image en terme de flou et de

bruit. Elle a été ensuite utilisée pour estimer les paramètres d'un modèle de bruit en optimisant cette mesure. L'avantage de cette méthode est qu'elle peut être aisément appliquée pour l'estimation d'un grand nombre de paramètres. Nous appliquons cette méthode pour l'estimation des paramètres d'une fonctionnelle que nous définissons dans le chapitre suivant pour le problème de restauration aveugle.

### 2.2.3.2 Cadre stochastique

Dans cette approche,  $f$  est modélisée par une variable aléatoire. Ceci permet d'appliquer par exemple, l'estimateur de maximum de vraisemblance qui consiste à maximiser par rapport à  $\alpha$ , la vraisemblance  $Pr_\alpha(g) = \sum_f Pr_\alpha(g|f) Pr_\alpha(f)$  [Jalobeanu 2002]. Ceci est également le principe des méthodes basées sur l'algorithme Espérance-Maximisation (EM) [Dempster 1977, Figueiredo 2003, Chaux 2012] qui permettent de maximiser l'espérance  $\mathbb{E}[Pr_\alpha(g|f)]$ . Celles-ci permettent d'estimer le paramètre de régularisation en itérant deux étapes : la première permet d'évaluer l'espérance  $\mathbb{E}[Pr_\alpha(g|f)]$ , et la deuxième permet de la maximiser par rapport à  $\alpha$ . La première étape fait appel à des algorithmes d'échantillonnage, ce qui posera le même problème que nous avons évoqué dans le paragraphe précédent : lenteur de calcul et difficulté de diagonalisation des termes d'attache aux données et de régularisation dans le même espace.

Une autre approche stochastique pour l'estimation de  $\alpha$  est l'approche bayésienne [Ichir 2006, Pesquet 1996, Orieux 2009] qui consiste à considérer  $\alpha$  comme étant une variable aléatoire. Une loi de probabilité a priori  $Pr(\alpha)$  est attribuée à la variable  $\alpha$ . L'estimation de  $\alpha$  peut se faire par différentes manières : soit au même temps que l'estimation de l'image en maximisant la probabilité a posteriori  $Pr(\alpha, f|g)$ , soit par marginalisation par rapport à l'inconnue  $f$ , soit aussi en appliquant un algorithme d'échantillonnage permettant de calculer l'estimateur a posteriori moyen  $\hat{\alpha} = \sum_{\alpha, f} \alpha Pr(\alpha, f|g)$ . Ces méthodes nécessitent aussi l'échantillonnage des distributions de probabilité sur les images, ce qui est numériquement difficile et coûteux.

## 2.3 État de l'art sur les méthodes de restauration : flou SV

La principale difficulté de la restauration avec un opérateur de flou SV est la complexité de calcul qui est très élevée pour des images volumineuses et/ou pour des PSFs à support large. En effet, l'opération de dégradation (équation (1.8)) n'est plus diagonalisable dans l'espace de Fourier, les calculs doivent alors se faire dans l'espace image (la complexité de calcul de cette opération est de l'ordre de  $O(n^2)$ ). L'utilisation d'une telle opération dans un algorithme itératif de reconstruction est alors prohibitive. La plupart des techniques de restauration qui existent actuellement sont fondées sur des approximations du flou SV permettant de réduire le coût de calcul. Nous pouvons les diviser en trois catégories.

Les premières méthodes consistent à décomposer l'image en des sous-images où le flou peut être supposé SI, ensuite appliquer sur chacune de ces sous-images, l'une des méthodes de déconvolution présentées précédemment, les sous-images obtenues

sont après rassemblées afin de construire l'image estimée [Trussell 1978, Ozkan 1994, Boden 1996, Shaevitz 2007, Řeřábek 2008]. Ceci conduit cependant à des artéfacts de décomposition dans l'image reconstruite. Une amélioration de cette méthode est proposée dans [Maalouf 2010] où les images déconvoluées sont combinées par des fonctions masques permettant de lisser les transitions entre les zones adjacentes. Les étapes de cette méthode dite EMMA ("Enhanced Merging Masks Algorithm") sont résumées dans la figure 2.13 (a). Elle a été particulièrement appliquée à des images de microscopie à champ large où le flou est supposé uniquement variable en profondeur. Des déconvolutions multiples sont alors effectuées séparément sur la totalité de l'image en utilisant des PSFs SI  $h^i, i = 1, \dots, M$  prises à différentes profondeurs, conduisant ainsi à un ensemble d'images déconvoluées  $\hat{f}^i, i = 1, \dots, M$ , avec  $M$  le nombre de PSFs considérées. Des fonctions masques  $\psi^i, i = 1, \dots, M$  variables uniquement en profondeurs comme exposé dans la figure 2.3 (a) permettent de fusionner les images résultats tout en évitant les artéfacts de décomposition. Le coût de la restauration est alors  $M$  fois le coût d'une déconvolution.

La deuxième catégorie de méthodes [Preza 2004, Nagy 1996, Cresci 2005, Aubailly 2007] consiste à utiliser un opérateur de flou SV dans la procédure itérative de restauration. Dans ces méthodes, l'opérateur de flou continument variable dans l'image est approchée par une combinaison linéaire de  $M$  opérateurs de flou SI diagonalisables dans l'espace de Fourier (des convolutions). Le coût de l'opération de dégradation se réduit alors à  $M$  fois le coût d'une convolution. Nous utilisons ce type d'approche dans notre solution de restauration. Nous détaillons cette approche dans le paragraphe suivant où nous comparons les modèles d'approximation du flou SV.

La troisième catégorie est une méthode qui a été récemment proposée dans [Escande 2012] où il a été montré qu'il est possible de diagonaliser l'opérateur de flou SV dans le domaine des ondelettes, l'inversion est alors faite comme dans le cas invariable par un algorithme primal-dual [Chambolle 2011]. Le coût de la restauration est alors similaire au coût d'une déconvolution.

Nous notons enfin que dans certains cas, par exemple lorsque le flou varie suivant une seule dimension ou lorsque le support de la PSF est petit, certains préfèrent n'utiliser aucune approximation du flou SV comme dans [Hajlaoui 2010] où l'opération de dégradation est calculée en tout point dans l'espace de l'image.

## 2.4 Modèle de flou SV

Pour une plus grande généralité et une modélisation plus proche de la physique, nous reprenons ici les notations continues pour  $f, \tilde{h}$ , et  $\tilde{H}$ . Le modèle de flou spatialement variable (SV) de l'équation (1.9) est prohibitif en terme de temps de calcul. L'approximation de ce modèle est alors une étape primordiale avant d'entamer la phase d'inversion. Les modèles d'approximation du flou SV qui existent dans la littérature peuvent être divisés en deux classes que nous comparons dans cette section.

### 2.4.1 Première classe de modèles d'approximation du flou SV

Dans certains des modèles d'approximation du flou SV comme [Nagy 1998, Bardsley 2006b, Gilad 2006], l'image dégradée par un flou SV est vue comme étant une combinaison convexe de  $M$  images dégradées par des PSFs SI que l'on note par  $h^i, i = 1, \dots, M$  :

$$\hat{H}(f)(u) = \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u) \cdot (h^i * f)(u) \quad (2.32)$$

où  $\psi^i : \mathbb{R}^3 \rightarrow [0, 1], 1 \leq i \leq M$  est un ensemble de fonctions de pondération tel que :  $\sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u) = 1, \forall u \in \mathbb{R}^3$ . Nous pouvons montrer que la PSF SV associée à ce modèle s'écrit comme suit :

$$\hat{h}(u, u') = \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u) \cdot h^i(u - u') \quad (2.33)$$

avec  $u = (x, y, z)$  une coordonnée dans l'espace image  $\mathcal{I}$  (espace du détecteur) et  $u' = (x', y', z')$  une coordonnée dans l'espace objet  $\mathcal{O}$  (espace du spécimen). Dans ce modèle, l'interpolation des PSFs (cf. équation (2.33)) est effectuée dans l'espace image  $\mathcal{I}$  (les fonctions d'interpolation  $\psi^i$  dépendent des coordonnées image  $u$ ).

### 2.4.2 Deuxième classe de modèles d'approximation du flou SV

Dans la deuxième classe de modèles d'approximation du flou SV, comme ceux proposés dans [Preza 2004, Hirsch 2010, Yuan 2011], les fonctions de pondérations sont d'abord appliquées à l'image originale  $f$  conduisant à une série d'images, chacune d'elles est convoluée par une PSF SI  $h^i$ , la combinaison des images résultant constitue l'approximation de l'image dégradée par un flou SV. Cette formulation est donnée par l'équation suivante :

$$\tilde{\tilde{H}}(f)(u) = \sum_{1 \leq i \leq M} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) \quad (2.34)$$

Nous pouvons montrer que la PSF SV associée à ce modèle s'écrit comme suit :

$$\tilde{\tilde{h}}(u, u') = \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u') \cdot h^i(u - u') \quad (2.35)$$

L'interpolation de la PSF SV se fait dans l'espace objet  $\mathcal{O}$  (les fonctions d'interpolation  $\psi^i$  dépendent des coordonnées objet  $u'$ ). Comme la PSF varie en fonction de la position du point source dans le domaine objet, l'interpolation dans le domaine objet est plus réaliste. Nous choisissons alors ce modèle d'approximation et vérifions certaines propriétés physiques de ce modèle. Nous comparons ensuite ces deux modèles d'approximation en se basant sur des tests numériques.

### 2.4.3 Propriétés du modèle choisi

Nous vérifions ici certaines propriétés du modèle choisi, liées au système optique comme la normalisation de la PSF et la conservation de flux. La conservation de flux signifie que le nombre de photons qui arrivent au détecteur est égale au nombre de photons

qui sont émis par le spécimen i.e.  $\int_{\mathcal{J}} \tilde{H}(f)(u) du = \int_{\mathcal{O}} f(u') du'$  (le système optique est supposé conservatif). La normalisation de la PSF signifie que le nombre de photons qui arrivent au détecteur suite à l'acquisition d'un point source placé à la position  $u'$  est égale à 1 i.e.  $\int_{\mathcal{J}} h(u, u') du = 1$ .

Nous montrons les lemmes suivants.

**Lemme 1.** *La conservation de flux est équivalente à la normalisation de la PSF dans le cas d'un flou SV donné par l'équation (1.8) :*

$$\begin{aligned} \int_{\mathcal{J}} \left[ \int_{\mathcal{O}} \tilde{h}(u, u') f(u') du' \right] du &= \int_{\mathcal{O}} f(u') du', \forall f \in L^1(\mathcal{O}) \\ \iff \int_{\mathcal{J}} \tilde{h}(u, u') du &= 1, \forall u' \in \mathcal{O} \end{aligned} \quad (2.36)$$

*Démonstration.* Supposons que la condition

$$\int_{\mathcal{J}} \left[ \int_{\mathcal{O}} \tilde{h}(u, u') f(u') du' \right] du = \int_{\mathcal{O}} f(u') du', \forall f \in L^1(\mathcal{O})$$

est satisfaite. En considérant que  $f(u')$  est une distribution de Dirac au point  $a \in \mathcal{O}$  i.e.  $f(u') = \delta_a(u')$ ,  $\forall a \in \mathcal{O}$ , on obtient :

$$\int_{\mathcal{J}} \int_{\mathcal{O}} \tilde{h}(u, u') \delta_a(u') du' du = \int_{\mathcal{O}} \delta_a(u') du', \forall a \in \mathcal{O}$$

Ce qui veut dire que  $\int_{\mathcal{J}} \tilde{h}(u, a) du = 1, \forall a \in \mathcal{O}$ .

Supposons maintenant que la PSF est normalisée i.e.

$$\int_{\mathcal{J}} \tilde{h}(u, u') du = 1, \forall u' \in \mathcal{O},$$

alors

$$\begin{aligned} \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathcal{O}} \tilde{h}(u, u') f(u') du' du &= \int_{\mathcal{O}} f(u') \left[ \int_{\mathcal{J}} \tilde{h}(u, u') du \right] du' \\ &= \int_{\mathcal{O}} f(u') du' \end{aligned}$$

□

Dans le cas d'un opérateur de flou stationnaire i.e. une convolution, cette propriété reste vraie si les ensembles  $\mathcal{O}$  et  $\mathcal{J}$  sont non-bornés (i.e.  $\mathcal{J} = \mathcal{O} = \mathbb{R}^3$ ). Si ces ensembles sont bornés, cette propriété n'est vraie que si le domaine image  $\mathcal{J}$  contient le domaine objet  $\mathcal{O}$  étendu par le support de la PSF. Cependant, en pratique nous cherchons à reconstruire une image  $f$  de même taille que les données  $g$  i.e. nous considérons  $\mathcal{O} = \mathcal{J}$ . Dans ce cas, la propriété d'équivalence entre la conservation de flux et la normalisation de la PSF n'est pas forcément vérifiée. Nous montrons que si  $f$  est périodique de période  $\mathcal{J}$  alors nous avons équivalence entre la normalisation de la PSF et la conservation de flux pour  $\mathcal{O} = \mathcal{J} \subset \mathbb{R}^3$ . Soient alors les deux ensembles suivants :



- $A = \{f \in \mathcal{L}^1(\mathcal{J}), \text{périodique, de période } \mathcal{J}\},$
- $B = \{h \in \mathcal{L}^1(\mathcal{J}), \text{supp}(h) = B(O, R) \subset \mathcal{J}\}.$  avec  $\text{supp}(h)$  désigne le support de  $h$ , qui est une boule fermée de centre  $O$  et de rayon  $R > 0$  incluse dans  $\mathcal{J}$ .

**Lemme 2.** *La conservation de flux est équivalente à la normalisation de la PSF dans le cas d'un flou SI donné par l'équation (1.8) : Soient  $f \in A$  et  $h \in B$ , nous avons :*

$$\int_{\mathcal{J}} f * h(u) du = \int_{\mathcal{J}} f(u) du \iff \int_{B(O, R)} h(u) du = 1 \quad (2.37)$$

*Démonstration.* Montrons tout d'abord le lemme suivant :

**Lemme 3.** *Soit  $f \in A$ , nous avons le résultat suivant :*

$$\int_{\mathcal{J}-\{z\}} f(u) du = \int_{\mathcal{J}} f(u) du, \forall z \in \mathbb{R}^3 \quad (2.38)$$

*Démonstration.* Sans perte de généralité, on considère  $\mathcal{J} = [-1, 1]$ , et  $f$  une fonction 2-périodique.

Premier cas :  $z \geq 0$

$$\begin{aligned} \int_{\mathcal{J}-\{z\}} f(u) du &= \int_{-1-z}^{1-z} f(u) du \\ &= \int_{-1-z}^{-1} f(u) du + \int_{-1}^1 f(u) du - \int_{1-z}^1 f(u) du \end{aligned} \quad (2.39)$$

Le premier terme de cette équation peut s'écrire comme suit :

$$\begin{aligned} \int_{-1-z}^{-1} f(u) du &= \int_{1-z}^1 f(y-2) dy \\ &= \int_{1-z}^1 f(u) du \end{aligned}$$

En remplaçant ce dernier résultat dans (2.39), nous obtenons :  $\int_{-1-z}^{1-z} f(u) du = \int_{-1}^1 f(u) du$ . La preuve est similaire pour  $z \leq 0$ .  $\square$

Maintenant, revenons à la preuve d'équivalence entre la conservation de flux et la normalisation de la PSF :

$$\begin{aligned} \int_{\mathcal{J}} f * h(u) du &= \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathbb{R}^3} h(u-u') f(u') du' du \\ &= \int_{\mathcal{J}} \int_{B(O, R)} h(z) f(u-z) dz du \\ &= \int_{B(O, R)} h(z) \left[ \int_{\mathcal{J}} f(u-z) du \right] dz \\ &= \int_{B(O, R)} h(z) \left[ \int_{\mathcal{J}-\{z\}} f(u) du \right] dz \end{aligned}$$

Grâce au lemme 3, nous avons :

$$\int_{\mathcal{S}} f * h(u) du = \int_{B(O,R)} h(z) dz \int_{\mathcal{S}} f(u) du$$

Ceci nous permet de déduire l'équivalence entre la conservation de flux et la normalisation de la PSF sur  $B(O, R)$ .  $\square$

**Remarque 2.** Pour réduire les artéfacts de bords lors de la restauration d'image, l'image  $f$  est souvent étendue par des zéros (si les bords de l'image sont nulles) ou en utilisant une version réfléchie ou périodisée de l'image [Aghdasi 1996]. Notons par  $\mathcal{S}'$  le support de la nouvelle image obtenue par extension de l'ancienne image  $f$ . Comme le produit de convolution est calculée par transformée de Fourier, l'image est supposée périodique de période  $\mathcal{S}'$ . Par conséquent, la conservation de flux n'est plus vérifiée sur le domaine  $\mathcal{S}$ , mais sur le domaine  $\mathcal{S}'$  (i.e. la période considérée dans la convolution circulaire).

Nous vérifions maintenant que les propriétés de normalisation de la PSF et de conservation de flux sont respectées par le modèle (2.34) et violées par le modèle (2.32).

#### 2.4.3.1 Normalisation de la PSF SV

**Lemme 4.** Soient  $f \in A$ ,  $h^i \in B$ ,  $1 \leq i \leq M$  tels que  $\int_{B(O,R)} h^i(u) = 1$ , et  $B(u', R)$  une sphère fermée de rayon  $R \in [0, 1]$  et de centre  $u' \in \mathbb{R}^3$ , nous avons alors le résultat suivant :

$$\int_{B(u',R)} \tilde{\tilde{h}}(u, u') du = 1, \forall u' \in \mathbb{R}^3 \quad (2.40)$$

*Démonstration.*

$$\begin{aligned} \int_{B(u',R)} \tilde{\tilde{h}}(u, u') du &= \int_{B(u',R)} \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u') h^i(u - u') du \\ &= \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u') \int_{B(u',R)} h^i(u - u') du \\ &= \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u') \int_{B(O,R)} h^i(t) dt \\ &= \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u') \\ &= 1 \end{aligned}$$

$\square$

**Remarque 3.** La normalisation de la PSF  $\tilde{\tilde{h}}(u, u')$  du modèle (2.35) n'est pas forcément vérifiée même si les fonctions  $h^i$  sont normalisées car les fonctions de pondération  $\psi^i$  dépendent des coordonnées image, coordonnées par rapport auxquelles l'intégration est calculée.

## 2.4.3.2 Conservation de flux pour le modèle SV

**Lemme 5.** Soient  $f \in A$ ,  $h^i \in B$  tels que  $\int_{B(O,R)} h^i(u) du = 1$  pour  $1 \leq i \leq M$ , nous avons :

$$\int_{\mathcal{J}} \tilde{\tilde{H}}(f)(u) du = \int_{\mathcal{J}} f(u) du \quad (2.41)$$

*Démonstration.* On a :

$$\begin{aligned} \int_{\mathcal{J}} \tilde{\tilde{H}}(f)(u) du &= \int_{\mathcal{J}} \sum_{1 \leq i \leq M} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du \\ &= \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{\mathcal{J}} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du \end{aligned} \quad (2.42)$$

Par ailleurs, comme  $h^i$ ,  $1 \leq i \leq M$  sont normalisées, nous obtenons à partir du lemme 2 :

$$\begin{aligned} \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{\mathcal{J}} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du &= \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{\mathcal{J}} \psi^i(u) \cdot f(u) du \\ &= \int_{\mathcal{J}} \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u) \cdot f(u) du \\ &= \int_{\mathcal{J}} f(u) du \end{aligned}$$

□

**Remarque 4.** Pour les mêmes raisons que précédemment ( $\psi^i$  dépendent des coordonnées image), la conservation de flux n'est pas vérifiée pour le modèle (2.32).

**Remarque 5.** Le modèle (2.35) préserve la symétrie de la PSF tandis que ce n'est pas le cas pour le modèle (2.33) i.e.

$$\forall v \in \mathcal{J}, \text{ si } h^i(u-v) = h^i(v-u) \text{ alors } \tilde{\tilde{h}}(u-v, u') = \tilde{\tilde{h}}(v-u, u') \quad (2.43)$$

**Remarque 6.** Les opérateurs  $\tilde{\tilde{H}}(\cdot)$  et  $\tilde{\tilde{H}}(\cdot)$  sont **conjugués** l'un de l'autre. En effet, soit  $\langle f, g \rangle$  le produit scalaire défini comme suit pour  $f, g \in \mathcal{L}^2(\mathcal{J})$  :

$$\langle f, g \rangle = \int_{\mathcal{J}} f(u) g(u) du \quad (2.44)$$

Notons par  $H^i = h^i * \cdot$  l'opérateur de flou SI et par  $H^{i*}$  son opérateur adjoint, nous avons

alors :

$$\begin{aligned}
\langle \tilde{\tilde{H}}(f), g \rangle &= \int_{\mathcal{J}} \sum_{1 \leq i \leq M} H^i(\psi^i \cdot f)(u) g(u) du \\
&= \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{\mathcal{J}} f(u) \psi^i(u) H^{i*}(g)(u) du \\
&= \int_{\mathcal{J}} \sum_{1 \leq i \leq M} f(u) \psi^i(u) H^{i*}(g)(u) du \\
&= \langle f, \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i H^{i*}(g) \rangle \\
&= \langle f, \tilde{\tilde{H}}(g) \rangle \\
&= \langle f, \tilde{\tilde{H}}^*(g) \rangle
\end{aligned}$$

#### 2.4.4 Comparaison des modèles

Nous comparons les PSFs et les images floues obtenues par chacun des modèles d'approximation (2.32) et (2.34) à celles obtenues par le modèle de référence, dans lequel la PSF est calculée par le modèle théorique (cf. cadre 1) et l'image floue est générée par l'équation (1.9). Nous avons vu dans les paragraphes précédents que le modèle (2.34) est plus réaliste que le modèle (2.32). Nous illustrons ceci par des tests numériques et nous comparons les erreurs d'approximation de ces deux modèles. Pour ce faire, nous considérons un système de microscopie confocale équipé d'un objectif à immersion 100X (IR de 1.5) avec une ouverture numérique de 1.4. La lamelle et le milieu de l'objet sont supposés d'IRs respectifs de 1.5 et 1.48. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 560nm et 600nm. Les pas d'échantillonnages radial et axial sont respectivement 50nm et 145nm. Pour ces paramètres d'acquisition, nous avons généré 10 PSFs à des profondeurs variant entre 0  $\mu m$  et 28.5  $\mu m$  par le modèle théorique présenté dans le premier chapitre de ce manuscrit. Les positions des PSFs  $h^1, \dots, h^{10}$  sont choisies de sorte que l'erreur entre deux PSFs successives ne dépasse pas 20%. Comme nous considérons une variation uniquement en profondeur, les fonctions de pondération  $\psi^i$  sont constantes suivant les axes (OX) et (OY), et varient linéairement suivant l'axe (OZ). Un exemple de variation linéaire de 5 fonctions de pondération est présenté dans la figure 2.3 (a). Le choix des positions des PSFs ainsi que la forme des fonctions de pondération sera discuté plus tard. Nous avons calculé les PSFs à une profondeur de 6  $\mu m$  en utilisant les équations (2.33) et (2.35) par l'interpolation de ces 10 PSFs. Les coupes axiales de ces deux PSFs sont présentées dans les figures 2.1 (b) et (d). Nous comparons ces PSFs avec la PSF théorique obtenue à la même profondeur (cf. figure 2.1 (a)). Nous remarquons à partir des images des erreurs absolues présentées dans les figures 2.1 (c) et (e) que l'erreur d'approximation est beaucoup plus faible pour le deuxième modèle et que pour le premier modèle.

Nous comparons également les images floutées par chacun des modèles (2.32) et (2.34) à l'image floutée par le modèle de référence donnée par l'équation (1.9) où pour chaque coupe en Z, une nouvelle PSF est calculée par le modèle théorique de Stokseth. Nous

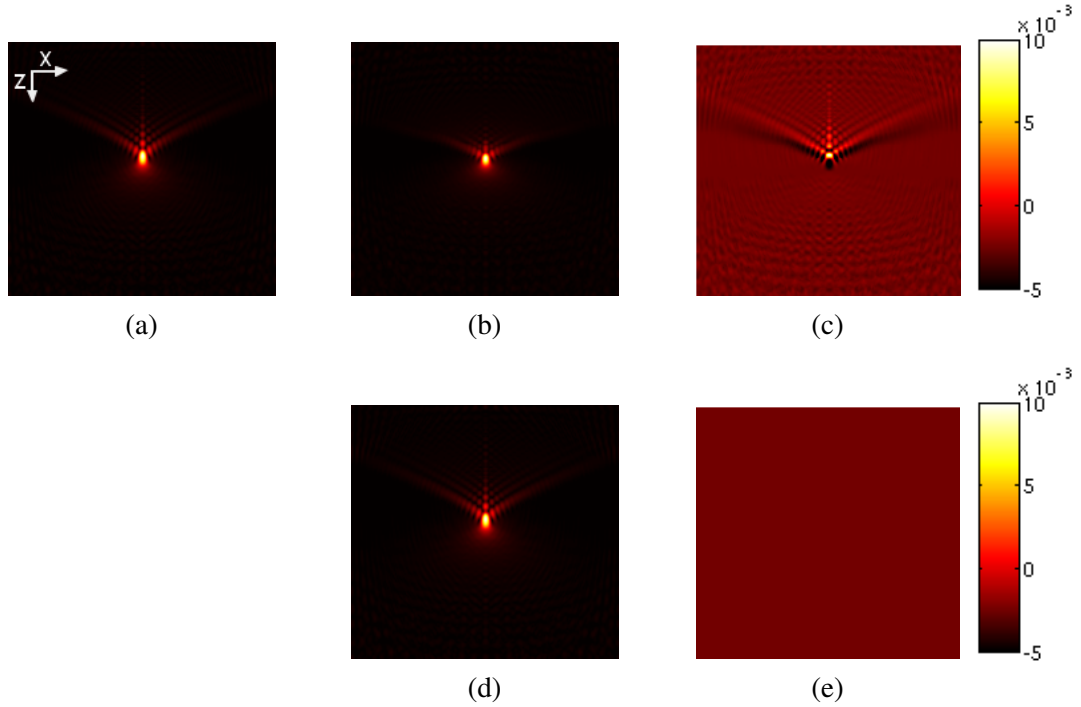


FIGURE 2.1 – Approximation de la PSF à une profondeur de  $6\mu m$  : Coupes  $(X,Z)$  de (a) la PSF théorique, (b) la PSF approchée par le modèle (2.33), (c) l’erreur entre la PSF du modèle (2.33) et la PSF théorique, (d) la PSF approchée par le modèle (2.35), (e) l’erreur entre la PSF du modèle (2.35) et la PSF théorique.

avons généré numériquement une image de 3 billes plongées dans un volume de  $200 \times 200 \times 190$  voxels. Une coupe axiale de cette image est présentée dans la figure 2.2 (a). Les coupes axiales des images floutées par le premier, le second modèle ainsi que le modèle de référence sont respectivement présentées sur les figures 2.2 (b), (e) et (d). Les images d’erreurs absolues entre l’image floue de référence et les images floutées par les modèles d’approximation (cf. figures 2.2 (c) et (f)) prouvent le succès du deuxième modèle par rapport au premier.

Pour finir cette étude, nous résumons dans la table 2.1, les valeurs de l’erreur quadratique moyenne normalisée (NMSE) et l’indice de similarité structurelle (SSIM), (cf. annexe B) calculées entre les images floutées par chacun des modèles d’approximation et l’image de référence pour différents nombres  $M$  de PSFs interpolées.

#### 2.4.5 Forme, position et nombre de fonctions de pondération

Après avoir choisi le modèle d’interpolation, une question importante est quelle est le nombre de PSFs nécessaires afin d’avoir une bonne approximation et comment choisir les fonctions de pondérations associées ?

Dans [Preza 2004], des fonctions de pondérations linéaires comme celles présentées

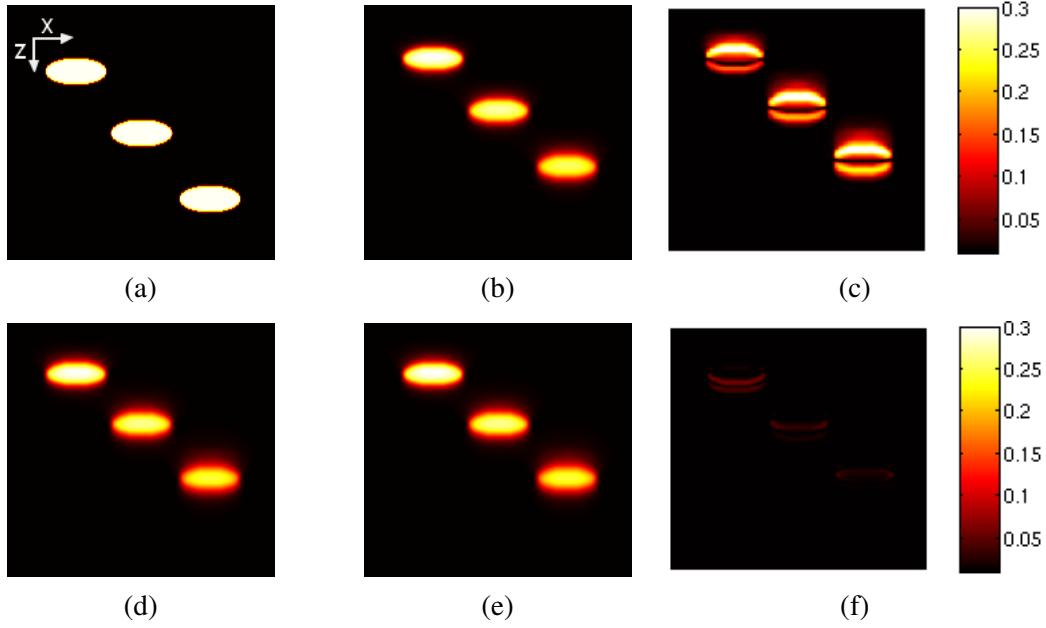


FIGURE 2.2 – Coupes  $(X, Z)$  de (a) l'image originale, (b) image floutée en utilisant le modèle (2.32), (d) image floutée par le modèle théorique de référence, (e) image floutée en utilisant le modèle (2.34), (c) et (f) présentent respectivement les erreurs absolues entre les images floutées par les modèles (2.32) et (2.34) et l'image de référence (d).

	Approximation du flou SV par le modèle $\tilde{H}$ (équation (2.32))		Approximation du flou SV par le modèle $\tilde{\tilde{H}}$ (équation (2.34))	
	NMSE	SSIM	NMSE	SSIM
M=5	12.13	0.92	0.74	0.99
M=20	12.01	0.93	0.01	1

TABLE 2.1 – Comparaison des erreurs d'approximation de flou SV.

dans la figure 2.3 (a) sont utilisées : à chaque PSF  $h^i$  calculée à une profondeur  $d^i$ , correspond une fonction de pondération  $\psi^i$  triangulaire qui est maximale à la position  $d^i$  (égale à 1) et qui décroît linéairement en s'éloignant de cette position jusqu'à atteindre une valeur nulle à la positions des PSFs adjacentes  $h^{i-1}$  et  $h^{i+1}$ . Si la PSF  $h^i$  n'a pas de prédécesseur  $h^{i-1}$  (ou respectivement n'a pas de successeur  $h^{i+1}$ ) alors la fonction  $\psi^i$  est constante (égale à 1) dans cet intervalle de points correspondant à des profondeurs inférieures à  $d^i$  (respectivement supérieures à  $d^i$ ). Les mêmes fonctions de pondération ont été reprises dans [Maalouf 2010] où une méthode pour le calcul automatique des positions des PSFs  $h^i$  a été proposée. L'idée de cette méthode est de fixer la position de la première PSF  $h^0$  et calculer ensuite les positions des autres PSFs de façon à ce que l'erreur relative entre deux PSFs successives  $h^i$  et  $h^{i+1}$  ne dépasse pas un seuil fixé (par exemple 10%).

Une méthode plus avancée où le nombre de PSFs et les fonctions de pondération

$\psi^i$  sont estimées par une analyse en composante principale (ACP), est proposée dans [Arigovindan 2010]. Dans cette méthode, une base de données de PSFs calculées à toutes les profondeurs du volume considéré est supposée connue, l'utilisateur fixe alors l'erreur d'approximation, la méthode permet de trouver un nombre minimal de PSFs les plus représentatives dans la base de données ainsi que les fonctions de pondération associées pour l'erreur fixée.

Ces deux fonctions de pondération i.e. fonctions triangulaires et fonctions estimées par ACP, sont comparées dans [Yuan 2011]. Cette comparaison a montré que bien que la méthode basée sur ACP offre une meilleure approximation de la PSF (toujours en comparaison avec la PSF théorique), les erreurs de restauration obtenues par ces deux méthodes d'interpolation sont pratiquement les mêmes.

Dans [Denis 2011], les PSFs  $h^i$  et les fonctions de pondération  $\psi^i$  sont estimées par minimisation de l'erreur quadratique moyenne entre la PSF théorique et la PSF d'approximation.

Nous proposons ici d'étudier le choix des fonctions de pondérations en comparant différentes fonctions possibles i.e. des fonctions Spline d'ordre 1, 2 et 3 [Unser 1993a, Unser 1993b] (voir figure 2.3 (a), (b) et (c)) à celles qui optimisent l'erreur quadratique (voir figure 2.3 (d)) suivant :

$$E = \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathcal{J}} \left[ \tilde{h}(u, u') - \check{h}(u, u') \right]^2 du' du \quad (2.45)$$

où  $\tilde{h}$  est la PSF SV de référence calculée pour chaque profondeur par le modèle de Stokseth (cf. cadre 1) et  $\check{h}$  est la PSF d'approximation calculée par le modèle (2.35)). Pour une interpolation de deux PSFs successives  $h^i$  et  $h^{i+1}$ , l'erreur s'écrit :

$$\begin{aligned} E^i(h^i, h^{i+1}) &= \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathcal{J}} \left[ \tilde{h}(u, u') - (\psi^i(u') h^i(u - u') + \psi^{i+1}(u') h^{i+1}(u - u')) \right]^2 du' du \\ &= \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathcal{J}} \left[ \tilde{h}(u, u') - (\psi^i(u') h^i(u - u') + (1 - \psi^i(u')) h^{i+1}(u - u')) \right]^2 du' du \end{aligned}$$

En annulant la dérivée première de cette expression par rapport à  $\psi^i$ , nous obtenons l'expression suivante des fonctions de pondération optimales :

$$\hat{\psi}^i(u') = \frac{\int_{\mathcal{J}} \left( h^{i+1}(u - u') - \tilde{h}(u, u') \right) \left( h^{i+1}(u - u') - h^i(u - u') \right) du}{\int_{\mathcal{J}} \left( h^{i+1}(u - u') - h^i(u - u') \right)^2 du} \quad (2.46)$$

Par ailleurs, nous prenons en compte le fait que  $\hat{\psi}^i(u') \in [0, 1]$  par une simple projection des valeurs obtenues par l'équation ci-dessus. En considérant les mêmes paramètres d'acquisition que dans le paragraphe précédent, nous avons généré par le modèle théorique, des PSFs à différentes profondeurs. Nous avons ensuite calculé l'approximation (2.35) en interpolant 5 PSFs équidistantes deux à deux. Les erreurs d'approximation normalisées calculées pour les différentes fonctions d'interpolation sont présentées dans la table 2.2. Les erreurs obtenues par des fonctions Spline d'ordre 2 et 3 est pratiquement la même du

fait que la forme de celles-ci est très similaire pour le faible nombre de points considérés dans l'interpolation (cf. figure 2.3). Ces fonctions donnent un erreur faible qui n'est pas très loin de celle obtenues par les fonctions optimales et celle obtenue par des fonctions linéaires. Nous choisissons alors dans la suite les fonctions Spline d'ordre 1 pour calculer l'approximation de la PSF SV.

La forme des fonctions de pondération étant fixée, nous souhaitons déterminer le nombre minimal de PSFs  $M$  assurant une faible erreur de restauration. Il est cependant difficile de fixer une telle erreur car ceci dépendra du conditionnement de l'opérateur de flou et de la méthode de restauration utilisée. Nous proposons alors d'utiliser une méthode inspirée de celle présentée dans [Maalouf 2010]. Nous fixons l'erreur maximale d'approximation, soit par exemple 10 %. Ensuite, nous fixons la première PSF  $h^1$ , par exemple celle calculée à une profondeur nulle. Nous déterminons ensuite la position et le nombre des PSFs  $h^i$  (calculée par le modèle de Stokseth) de sorte que l'erreur d'approximation (équation (2.45)) ne dépasse pas l'erreur maximale fixée. Autrement dit, en balayant les différentes profondeurs du spécimen, si l'erreur d'approximation obtenue par deux PSFs successives (la PSF  $h^i$  et la PSF  $h_d$  calculée à la profondeur courante  $d$ ) dépasse un seuil fixé, on positionne une nouvelle PSF  $h^{i+1} = h_d$ . L'algorithme que nous appliquons est le suivant :

---

**Algorithme 1** Position et nombre des PSFs
 

---

**Initialisation :**

 Fixer l'erreur d'approximation maximale  $E_{max}$ ,

 Fixer la profondeur maximale  $d_{max}$  i.e. épaisseur du spécimen,

 Initialiser l'indice de la PSF  $i = 1$ ,

 Fixer la profondeur initiale  $d_i$  et calculer la PSF associée  $h_{d_i}$ ,

 $h^i \leftarrow h_{d_i}$ ,

**pour chaque** profondeur  $d > d_i$ ,  $d \leq d_{max}$  **faire**

 Calculer la PSF  $h_d$  à la profondeur  $d$ ,

 Calculer l'erreur d'approximation  $E$  obtenue à partir de l'interpolation de  $h^i$  et  $h_d$  (cf. équation (2.46)),

**si**  $E \geq E_{max}$  **alors**
 $i \leftarrow i + 1$ 
 $h^i \leftarrow h_d$ 
 $d_i \leftarrow d$ 
**finsi**
**fin**
**si**  $d_i < d_{max}$  **alors**

 Calculer la PSF  $h_{d_{max}}$  à la profondeur  $d_{max}$ ,

 $i \leftarrow i + 1$ 
 $h^i \leftarrow h_{d_{max}}$ 
 $d_i \leftarrow d_{max}$ 
**finsi**


---

En suivant cette stratégie, nous avons tracé dans la figure 2.4 une carte des positions des PSFs pour différentes variations d'IRs entre le milieu d'immersion et le spécimen. À



partir de cette figure, nous remarquons que le nombre de PSFs est plus important au début qu'à la fin du volume et que le nombre de PSFs est plus faible pour les faibles variations d'IRs. Ceci correspond à l'étude des aberrations présentée dans le premier chapitre de ce manuscrit.

Dans ce travail, nous appliquons cette méthode pour fixer la forme, la position et le nombre de fonctions de pondération i.e. des fonctions linéaires dont la position est fixée de sorte que l'erreur d'approximation maximale est de 10 %. Dans cette étude, la PSF est supposée connue en tout point par la connaissance des paramètres physiques d'acquisition et l'utilisation du modèle de Stokseth pour le calcul des PSFs. Dans le cas d'observation réelle, les PSFs ne sont pas connues mais peuvent être fixées approximativement par la connaissance a priori des paramètres du système.

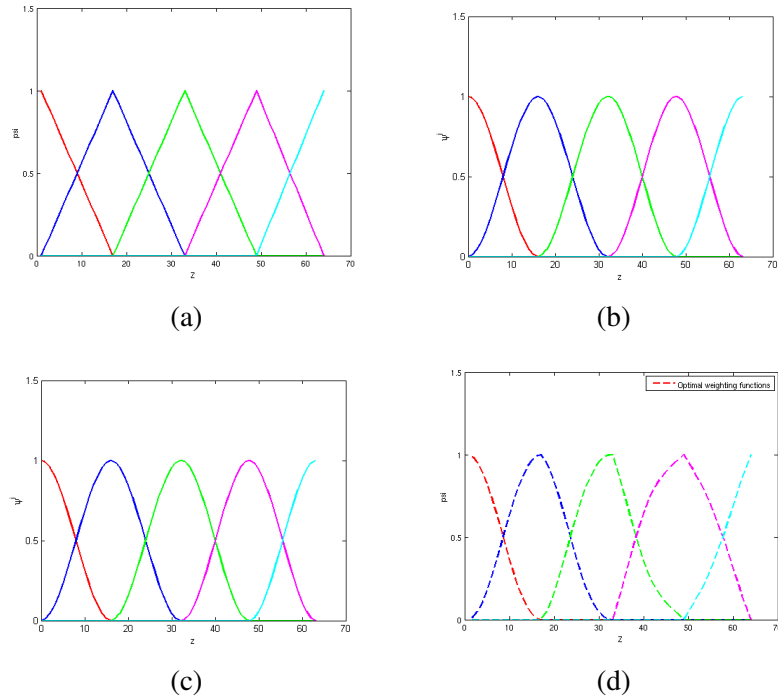


FIGURE 2.3 – Différentes fonctions de pondération utilisées pour calculer l'erreur d'approximation : (a) fonctions linéaires (Spline d'ordre 1), (b) fonctions quadratiques (Spline d'ordre 2), (c) fonctions cubiques (Spline d'ordre 3), (d) fonctions optimales obtenues en minimisant l'erreur quadratique entre la PSF théorique et la PSF du modèle d'approximation.

## 2.5 Restauration avec un opérateur de flou SV

Après avoir défini le modèle d'approximation du flou variable en profondeur, nous nous intéressons dans cette section à la restauration par l'inversion de ce modèle. Nous avons présenté dans la section 2.3 une classification des méthodes de restauration qui existent

	Spline d'ordre 0	Spline d'ordre 1	Spline d'ordre 2	Spline d'ordre 3	fonctions optimales
Erreur normalisée	0.9441	0.2131	0.2082	0.2082	0.2005

TABLE 2.2 – Erreurs d'interpolation pour différentes fonctions de pondération.

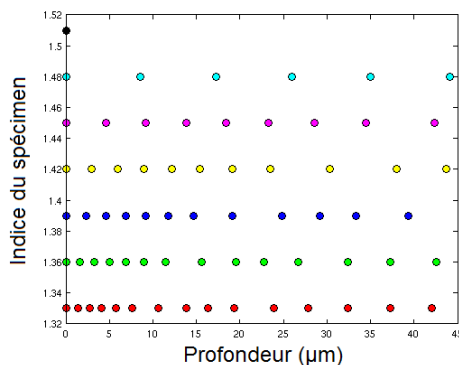


FIGURE 2.4 – Position des PSFs calculées par la technique proposée pour différentes variations d'IRs : l'IR du milieu d'immersion étant fixé à  $n_i = 1.515$ , nous avons fait varier l'IR  $n_s$  du spécimen entre 1.33 et 1.51. Les points en rouge correspondent à  $n_s = 1.33$ , les points en vert correspondent à  $n_s = 1.36$ , les points en bleu correspondent à  $n_s = 1.39$ , les points en jaune correspondent à  $n_s = 1.42$ , les points en rose correspondent à  $n_s = 1.45$ , les points en bleu ciel correspondent à  $n_s = 1.48$ , et le point en noir correspond à une seule PSF pour  $n_s = 1.515$ .

dans la littérature. La deuxième classe de méthodes où l'inversion est effectuée par un opérateur de flou SV semble plus encourageante que la première classe de méthodes où l'inversion est effectuée sur les différentes régions de l'image par un opérateur de flou SI. Par ailleurs, les méthodes d'inversion par un opérateur SV proposées dans la littérature présentent certaines limites : du fait qu'elles sont basées sur des algorithmes d'optimisation classiques de descente de gradient, celles-ci sont très lentes à converger. Par exemple, dans [Preza 2004], l'algorithme de MLEM [Dempster 1977, Shepp 1982] est appliqué à la restauration des images de microscopie de fluorescence 3D avec une PSF variable en profondeur. Aucune régularité n'est imposée sur l'image pour réduire la sensibilité au bruit. Le même principe est ensuite repris dans [Hirsch 2010] pour des images 2D de caméra. Dans [Nagy 1996], un algorithme plus rapide de gradient conjugué préconditionné est adapté à un opérateur de flou SV, mais cet opérateur est classé parmi les modèles de l'équation (2.32), ce qui conduit à une erreur d'approximation du flou SV élevée comme nous l'avons montré au paragraphe 2.4.4.

Étant donné le gros volume des images de microscopie de fluorescence 3D (typiquement de  $1104 \times 1104 \times 100$  voxels) que nous traitons dans cette thèse, nous cherchons à appliquer des algorithmes rapides pour l'inversion de l'opérateur de flou SV choisi (cf.

équation (2.34)). Nous considérons deux conditions de bruit i.e. le bruit poissonien présent dans les images de microscopie confocale à cause de la faible luminosité, et le bruit gaussien qui domine les images de microscopie à champ large à cause de la forte luminosité. Nous proposons alors deux méthodes de restauration rapides, chacune adaptée à la statistique de bruit considéré.

### 2.5.1 Restauration en présence de bruit de Poisson

Nous considérons ici le bruit de Poisson présent dans les images de microscopie confocale. L'image dégradée  $g$  suit une loi de poisson de moyenne et variance  $\tilde{H}(f) + b_g$ . Les fonctions de pondération  $\psi^i$  et les PSFs  $h^i$  sont fixées comme dans la section 2.4.5. Différentes méthodes de déconvolution (cf. section 2.2) peuvent être adaptées à l'opérateur de flou SV considéré. Les approches stochastiques (cf. paragraphe 2.2.2) sont très coûteuses en temps de calcul, notamment pour la statistique de bruit poissonienne qui ne peut être facilement diagonalisable dans l'espace de Fourier. L'utilisation de ces méthodes pour l'imagerie 3D de microscopie confocale est alors prohibitive. Les méthodes déterministes sont relativement plus rapides. Nous proposons d'utiliser une approche déterministe afin d'estimer l'image  $f$ . Nous cherchons à minimiser le critère régularisé suivant :

$$J(f) = \sum_{i \in \mathcal{I}^d} \left[ \tilde{H}(f)(i) + b_g - g(i) \log \left( \tilde{H}(f)(i) + b_g \right) \right] + \alpha \|\nabla f\|_1 \quad (2.47)$$

Nous pouvons facilement montrer que cette fonctionnelle est convexe, strictement convexe si les données  $g$  sont strictement positives. Différents algorithmes d'optimisation peuvent être appliqués. Par exemple, un des algorithmes les plus utilisés est la méthode de Newton [Boyd 2004] assure une convergence rapide mais elle est inapplicable à notre problème à cause du coût de calcul élevé de la matrice Hessienne pour le grand volume de données traité. Une méthode récemment proposée dans [Bonettini 2009] permet d'approcher l'inverse de la matrice hessienne par une matrice rapide à calculer. Il s'agit de la méthode de *gradient projeté remis à échelle* ou "Scaled Gradient Projection (SGP) method" en anglais. Nous choisissons cette méthode pour résoudre notre problème d'optimisation. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet une convergence rapide tout en incorporant naturellement des contraintes sur la variable à estimer.

Dans ce qui suit, nous présentons tout d'abord la méthode SGP sous sa forme générale. Nous montrons ensuite comment nous l'avons appliquée à notre problème d'estimation. Nous la testons enfin sur des images simulées et réelles de microscopie confocale et nous la comparons avec la version régularisée de l'algorithme de RL adaptée à l'opérateur de flou SV considéré.

#### 2.5.1.1 Algorithme SGP

La méthode SGP a été proposée dans [Bonettini 2009] pour la résolution de problèmes d'optimisation convexe de la forme suivante :

$$\min_{\mathbf{x} \in \Omega} \mathbf{J}(\mathbf{x}) \quad (2.48)$$

où  $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_n)^T \in \mathbb{R}^n$  est un vecteur de dimension  $n$ ,  $\Omega \subset \mathbb{R}^n$  est un ensemble convexe fermé, et  $\mathbf{J} : \Omega \rightarrow \mathbb{R}$  est une fonction convexe différentiable. Pour la fonctionnelle considérée (équation (2.47)), nous utilisons une approximation régulière de la norme  $l_1$  (cf. équation (2.25)). La méthode SGP a été initialement appliquée au problème de déconvolution d'image par minimisation du critère de Kullback-Leibler sans aucun terme de régularisation et avec des contraintes de positivité et de conservation et de flux [Bonettini 2009]. Cette méthode a été ensuite appliquée au problème de débruitage d'image où un terme de variation totale a été considéré [Zanella 2009]. Nous l'avons adapté au problème de restauration d'image avec un flou variable et un bruit de Poisson, en utilisant une régularisation par variation totale.

Tout le succès de cette méthode provient de l'utilisation d'une technique adéquate de sélection du pas de descente ainsi que d'une matrice dite *matrice de remise à échelle* ou "scaling matrix" en anglais. Cette matrice permet d'approcher l'inverse de la matrice hessienne de la fonctionnelle considérée et d'obtenir ainsi des propriétés quasi-Newton, ce qui permet de faire converger l'algorithme en un faible nombre d'itérations. La méthode permet de résoudre le problème (2.48) en approchant le point fixe suivant :

$$\mathbf{x}^* = P_{\Omega, S}(\mathbf{x}^* - \delta S \nabla \mathbf{J}(\mathbf{x}^*)) \quad (2.49)$$

où  $\delta$  est un scalaire positif correspondant au pas de descente et  $S \in \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^n$  est une matrice symétrique définie positive qui correspond à la matrice de remise à échelle.  $P_{\Omega, S} : \mathbb{R}^n \rightarrow \Omega$  est l'opérateur de projection sur l'ensemble  $\Omega$  exprimé comme suit :

$$P_{\Omega, S}(\mathbf{x}) = \arg \min_{\mathbf{y} \in \Omega} \|\mathbf{y} - \mathbf{x}\|_S \quad (2.50)$$

où  $\|\cdot\|_S$  est la norme définie comme suit pour une matrice  $S$  symétrique définie positive :

$$\|\mathbf{x}\|_S = \sqrt{\mathbf{x}^T S \mathbf{x}}. \quad (2.51)$$

Des techniques de choix du pas de descente et de la matrice de remise à échelle sont proposées dans [Bonettini 2009] afin que la matrice  $(\delta S)$  utilisé dans l'équation (2.49) permet d'approcher l'inverse de la matrice hessienne de  $\mathbf{J}(\cdot)$ .  $\delta$  est calculé par une méthode d'alternance adaptative des lois de Barzilai Borwein [Barzilai 1988, Frassoldati 2008, Bonettini 2009], et  $S$  est calculée à partir des conditions Karush-Kuhn-Tucker (KKT) comme nous l'expliquons plus loin. Par ailleurs, la convergence de la méthode SGP [Bonettini 2009] est prouvée lorsque les composantes diagonales  $(s_i)_{1 \leq i \leq n}$  de  $S$  vérifient :

$$\frac{1}{L} \leq s_i \leq L, L > 1 \quad (2.52)$$

où  $L$  est une constante de très grande valeur (autour de  $10^{10}$  comme suggéré dans [Bonettini 2009]) pour assurer le fait que  $S$  définie positive à valeurs bornées. L'algorithme proposé est énoncé comme suit :

**Algorithme 2** Optimisation par SGP**Initialisation :**

Choisir le vecteur de paramètres initial  $\mathbf{x}^{(0)}$ ,  
 Choisir des scalaires  $\gamma, \theta \in [0, 1]$ ,  $\varepsilon = 10^{-10}$  et un nombre  $R > 0$ ,  
 Choisir les bornes  $\delta_{min}$  et  $\delta_{max}$  telles que  $0 \leq \delta_{min} \leq \delta_{max}$ ,  
 $k \leftarrow 0$

**répéter**

Étape 1 : Choisir  $\delta^{(k)} \in [\delta_{min}, \delta_{max}]$  et la matrice de remise à échelle  $S^{(k)}$  (ceci sera discuté plus tard).

Étape 2 : Projection :  $\mathbf{y}^{(k)} = P_{\Omega, S}(\mathbf{x}^{(k)} - \delta S^{(k)} \nabla \mathbf{J}(\mathbf{x}^{(k)}))$ .

Étape 3 : Choisir la direction de descente :  $\mathbf{d}^{(k)} = \mathbf{y}^{(k)} - \mathbf{x}^{(k)}$ .

Étape 4 : Choisir  $\lambda^{(k)} = 1$  et  $\mathbf{J}_{max} = \max_{0 \leq j \leq \min(k, R-1)} \mathbf{J}(\mathbf{x}^{(k-j)})$ .

Étape 5 : Choisir le pas de descente  $\lambda^{(k)}$

**répéter**

**si**  $\mathbf{J}(\mathbf{x}^{(k)} + \lambda^{(k)} \mathbf{d}^{(k)}) \leq \mathbf{J}_{max} + \gamma \lambda^{(k)} \nabla \mathbf{J}(\mathbf{x}^{(k)}) \mathbf{d}^{(k)}$  **alors**

| Aller à l'étape 6

**sinon**

|  $\lambda^{(k)} = \theta \lambda^{(k)}$  et aller à l'étape 5

**fin**

**jusqu'à**  $\lambda^{(k)} \leq \varepsilon$ ;

Étape 6 :  $\mathbf{x}^{(k)} = \mathbf{x}^{(k)} + \lambda^{(k)} \mathbf{d}^{(k)}$  et  $k \leftarrow k + 1$

**jusqu'à** le critère d'arrêt est vérifié;

Comme illustré dans [Bonettini 2009], le choix adéquat du pas de descente par l'alternance des lois de Barzilai-Borwein (BB) données par les équations suivantes permet d'assurer une convergence rapide de l'algorithme proposé :

$$\delta_1^{(k)} = \frac{\mathbf{z}^{(k-1)T} S^{(k)-1} S^{(k)-1} \mathbf{z}^{(k-1)}}{\mathbf{z}^{(k-1)T} S^{(k)-1} \mathbf{t}^{(k-1)}} \quad (2.53)$$

$$\delta_2^{(k)} = \frac{\mathbf{z}^{(k-1)T} S^{(k)} S^{(k)-1} \mathbf{t}^{(k-1)}}{\mathbf{t}^{(k-1)T} S^{(k)} S^{(k)} \mathbf{t}^{(k-1)}} \quad (2.54)$$

avec  $\mathbf{z}^{(k)} = \mathbf{x}^{(k)} - \mathbf{x}^{(k-1)}$  et  $\mathbf{t}^{(k)} = \nabla \mathbf{J}(\mathbf{x}^{(k)}) - \nabla \mathbf{J}(\mathbf{x}^{(k-1)})$ ,  $k$  étant le compteur des itérations. L'alternance "adaptative" entre ces deux lois est réalisée par le biais d'une variable  $\tau^{(k)}$  qui permet d'éviter de stagner en une seule règle et de bénéficier des avantages des deux lois. À partir d'une valeur initiale  $\tau^{(0)} \in [0, 1]$ , l'alternance entre ces lois se fait comme suit :

**si**  $\frac{\delta_2^{(k)}}{\delta_1^{(k)}} \leq \tau^{(k)}$  **alors**

|  $\delta^{(k)} = \min\{\delta_2^{(j)}, j = \max\{1, k - R_\delta\}, \dots, k\}$

|  $\tau^{(k)} = 0.9 \tau^{(k)}$

**sinon**

|  $\delta^{(k)} = \delta_1^{(k)}$

|  $\tau^{(k)} = 1.1 \tau^{(k)}$ .

**fin**

où  $R_\delta$  un entier fixé.

En ce qui concerne le choix de la matrice de remise à échelle  $S$ , il doit assurer une convergence rapide sans pour autant augmenter le coût calculatoire. Par exemple, l'utilisation de la matrice d'identité est rapide à calculer mais n'accélère pas de convergence de l'algorithme car ceci revient à effectuer une méthode de descente de gradient classique dans laquelle le pas de descente est calculé par les lois de Barzilai-Borwein. L'utilisation de l'inverse de la matrice hessienne améliore la vitesse de convergence mais le calcul de cette dernière est lent. Nous donnerons plus tard une expression de la matrice  $S$  qui améliore la vitesse en convergence par rapport à la méthode RL tout en assurant un faible coût calculatoire.

Nous montrons dans le paragraphe suivant comment nous appliquons l'algorithme SGP pour minimiser la fonctionnelle (2.47).

### 2.5.1.2 Algorithme SGP pour la restauration SV

Considérons les notations vectorielles-matriciels introduites dans le premier chapitre de ce manuscrit. Les images originale et dégradée sont respectivement représentées par des vecteurs  $\mathbf{f}, \mathbf{g} \in \mathbb{R}^n$ . Les PSFs sont modélisées par des matrices  $\mathbf{H}^i \in \mathbb{R}^{n \times n}$ ,  $i = 1, \dots, M$  circulantes par blocs circulants par blocs circulants. Les convolutions circulaires sont calculées par multiplication matrice-vecteur ( $\mathbf{H}^i \mathbf{f}$ ). Les fonctions de pondération sont modélisées par des matrices diagonales  $\psi^i \in \mathbb{R}^{n \times n}$ ,  $i = 1, \dots, M$ . La fonction à minimiser s'écrit comme suit :

$$\mathbf{J}(\mathbf{f}) = \mathbf{1}^T \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \mathbf{H}^i \psi^i \mathbf{f} + \mathbf{b}_g \right) - \mathbf{g}^T \log \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \mathbf{H}^i \psi^i \mathbf{f} + \mathbf{b}_g \right) + \alpha \|\nabla \mathbf{f}\|_1 \quad (2.55)$$

où  $\mathbf{1} \in \mathbb{R}^n$  et  $\mathbf{b}_g \in \mathbb{R}^n$  sont des vecteurs constants (dont les composantes sont toutes égales) modélisant respectivement le vecteur unité et le bruit de fond.

Nous appliquons à cette fonctionnelle la méthode SGP avec les contraintes de positivité et de conservation de flux. Il suffit alors d'exprimer le gradient  $\nabla \mathbf{J}$  et la matrice de remise à échelle  $S$ , le reste de l'algorithme est comme décrit dans le paragraphe précédent. Notons par  $\nabla \mathbf{J}^R(\mathbf{f})$  le gradient du terme de régularisation (i.e. variation totale), le gradient de la fonctionnelle globale s'écrit comme suit :

$$\nabla \mathbf{J}(\mathbf{f}) = \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i \mathbf{H}^{iT} (\mathbf{1} - Y^{-1} \mathbf{g}) + \alpha \nabla \mathbf{J}^R(\mathbf{f}) \quad (2.56)$$

où  $Y$  est une matrice diagonale donnée par  $Y = \text{diag} \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \mathbf{H}^i \psi^i \mathbf{f} + \mathbf{b}_g \right)$ . Comme les PSFs sont normalisées, nous avons  $\sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i \mathbf{H}^{iT} \mathbf{1} = \mathbf{1}$ . L'expression (2.56) est donc simplifiée comme suit :

$$\nabla \mathbf{J}(\mathbf{f}) = \mathbf{1} - \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i \mathbf{H}^{iT} Y^{-1} \mathbf{g} + \alpha \nabla \mathbf{J}^R(\mathbf{f}) \quad (2.57)$$

D'une manière similaire à [Zanella 2009], nous décomposons le gradient du terme de régularisation  $\nabla \mathbf{J}^R(\mathbf{f})$  en deux termes positives  $V^R(\mathbf{f})$ ,  $U^R(\mathbf{f}) \in \mathbb{R}_+^n$  comme suit :

$$-\nabla \mathbf{J}^R(\mathbf{f}) = U^R(\mathbf{f}) - V^R(\mathbf{f}) \quad (2.58)$$

Un exemple d'une telle décomposition est donné en annexe A. Nous obtenons alors :

$$-\nabla \mathbf{J}(\mathbf{f}) = \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i \mathbf{H}^i T Y^{-1} \mathbf{g} + \alpha U^R(\mathbf{f}) \right) - (\mathbf{1} + \alpha V^R(\mathbf{f})) \quad (2.59)$$

Un minimum  $\mathbf{f}^*$  de la fonction (2.55) vérifie  $\mathbf{f}^* \nabla \mathbf{J}(\mathbf{f}^*) = 0$ . Ainsi, une itération minimisante de  $\mathbf{J}(\mathbf{f})$  s'écrit comme suit :

$$\mathbf{f}^{(k+1)} = Z^{(k)-1} \mathbf{f}^{(k)} \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i \mathbf{H}^i T Y^{(k)-1} \mathbf{g} + \alpha U^R(\mathbf{f}^{(k)}) \right) \quad (2.60)$$

où  $Z^{(k)}$  est une matrice diagonale donnée par  $Z^{(k)} = \text{diag}(\mathbf{1} + \alpha V^R(\mathbf{f}^{(k)}))$ . L'équation ci-dessus peut être vu comme une version régularisée de l'algorithme de Richardson-Lucy (RL). Son avantage par rapport à celle de l'algorithme classique de RLTV [Dey 2006] (cf. équation (2.29)) est qu'elle préserve la positivité de l'estimée  $\mathbf{f}$ , ceci est grâce à la technique de décomposition du gradient du terme de régularisation. En outre, on peut montrer que l'équation (2.60) peut être exprimée comme suit :

$$\mathbf{f}^{(k+1)} = \mathbf{f}^{(k)} - Z^{(k)-1} \mathbf{f}^{(k)} \nabla \mathbf{J}(\mathbf{f}^{(k)}) \quad (2.61)$$

Cette itération correspond à une itération de l'algorithme SGP pour  $\delta^{(k)} = 1$  et pour  $S^{(k)}$  exprimée comme suit :

$$S^{(k)} = \text{diag}(Z^{(k)-1} \mathbf{f}^{(k)}) \quad (2.62)$$

Pour assurer la condition (2.52), les composantes diagonales  $s_i^{(k)}$ ,  $i = 1, \dots, N$  de  $S^{(k)}$  sont ajustées comme suit :

$$s_i^{(k)} = \min\{L, \max\{\frac{1}{L}, s_i^{(k)}\}\}, i = 1, \dots, N, L > 1. \quad (2.63)$$

$L$  doit être fixé à une grande valeur (e.g.  $L = 10^{10}$  dans nos tests, comme suggéré dans [Bonettini 2009]). En calculant  $\nabla \mathbf{J}(\mathbf{f})$  comme dans (2.59) et en choisissant  $S$  comme dans (2.62) et (2.63), nous pouvons facilement appliquer l'algorithme SGP pour l'estimation de  $\mathbf{f}$ .

### 2.5.1.3 Tests et comparaison

Nous testons la méthode proposée sur des images simulées et réelles de microscopie confocale (CLSM). Nous présentons des comparaisons avec deux autres méthodes. Tout d'abord, nous montrons l'intérêt de la restauration par un opérateur SV en comparant notre méthode à la restauration classique par une PSF SI. Ensuite, nous montrons l'intérêt de

la méthode SGP en la comparant avec la méthode RL-TV adaptée à une PSF SV. Pour évaluer nos résultats, nous utilisons deux métriques de qualité qui nous permettent de comparer l'image restaurée à l'image originale de référence. La première métrique est l'erreur quadratique moyenne normalisée (NMSE) et la deuxième est l'indice de similarité structurale (SSIM) permettant de comparer les structures des deux images. Ces deux métriques sont explicitées en annexe B. Par ailleurs, nous donnons les temps de calculs de nos algorithmes, ceux-ci sont exécutés sur une machine ayant un micro-processeur à 8 coeurs cadencés à  $2.40\text{ GHz}$ .

### 2.5.1.3.a Test sur une image simulée de CLSM :

**Simulations des données** Notre premier test est effectué sur une image de  $128 \times 128$  voxels, de quatre billes ayant chacune un diamètre de  $2.25\text{ }\mu\text{m}$  (cf. figure 2.7 (a)). L'image dégradée est supposée acquise par un microscope confocal ayant un objectif à immersion (IR = 1.515), de grossissement 100X, et d'ouverture numérique 1.2. Les billes sont supposées plongées dans un milieu d'IR 1.46. Les longueurs d'onde des lumières d'excitation et d'émission sont respectivement  $560\text{ nm}$  et  $600\text{ nm}$ . Le diamètre de l'ouverture diaphragme (pinhole) est de  $1\text{ AU}$ . Les pas d'échantillonnage latéral et axial sont respectivement de  $0.06\text{ }\mu\text{m}$  et  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ . C'est pourquoi les billes apparaissent aplaties en coupes ( $X, Z$ ). Connaissant tous ces paramètres d'acquisition, nous avons généré 128 PSFs par le modèle théorique (cf. paragraphe 1.4.1), chacune correspond à une coupe en  $Z$ . Nous avons appliqué ces PSFs à l'image originale de billes de la figure 2.7 (a) en suivant le modèle (1.9). Nous avons ensuite ajouté à cette image une constante de bruit de fond  $b_g = 10^{-8}$  et un bruit de Poisson. L'image obtenue avec un rapport signal sur bruit de 20, 25 dB est présentée dans la figure 2.7 (b). À cause des aberrations sphériques, les billes sont déplacées de leurs positions initiales. La restauration de cette image est effectuée en fixant le paramètre de régularisation à  $\alpha = 10^{-3}$ .

**Test et comparaison avec la restauration SI :** Pour effectuer la restauration variable en profondeur, nous avons considéré 7 PSFs dont les positions sont choisies de telle sorte que l'erreur d'approximation par rapport à la PSF théorique ne dépasse pas 10 %, la première PSF étant prise juste au dessous de la lamelle (à une profondeur nulle). Les fonctions de pondération sont constantes suivant les axes ( $OX$ ) et ( $OY$ ) et varient linéairement suivant l'axe ( $OZ$ ). Une coupe axiale de l'image restaurée par notre méthode d'inversion est présentée dans la figure 2.7 (d). Nous comparons ce résultat avec celui obtenu avec une seule PSF, celle qui se trouve immédiatement au dessous de la lamelle, cf. figure 2.7 (c).

Afin de mieux comparer ces résultats, nous montrons dans la figure 2.5 les lignes d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) passant à travers les centres des billes. Celles-ci montrent l'avantage de notre méthode par rapport à la restauration par une PSF SI. En effet, la forme et la position des billes qui se trouvent au fond de l'échantillon (i.e. dans le sens de croissance du  $z$ ) sont mieux reconstruites avec notre méthode proposée. Par ailleurs, nous donnons dans la table 2.3, les temps de calcul moyen ainsi que les valeurs moyennes de NMSE et SSIM calculées entre chacune des images restaurées et l'image originale pour 30 réalisations de bruit de poisson. Ces réalisations sont des images dont les valeurs des



voxels sont tirées aléatoirement suivant un processus de Poisson multidimensionnel ayant pour moyenne et variance l'image floue à laquelle est ajoutée la constante de bruit de fond. Ces résultats montrent l'avantage de la restauration SV malgré son temps de calcul élevé par rapport à celui de la restauration avec une PSF SI.

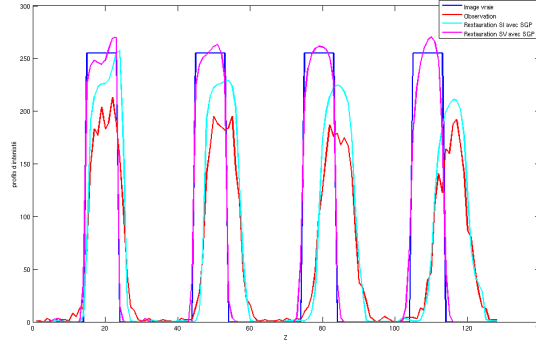


FIGURE 2.5 – Profils d'intensité passant par les centres des billes le long de l'axe ( $OZ$ ) de l'image originale (bleu), de l'image dégradée (rouge), de la restauration avec une PSF SI (bleu ciel), et de la restauration avec l'opérateur  $\tilde{H}$  (rose).

Bruit	Poisson		Gauss	
	SI	SV	SI	SV
NMSE moyen (%)	80.80	4.8234	60.50	32.02
SSIM moyen	0.5246	0.9746	0.56	0.746
Temps moyen (mn)	2.62	6.99	3.2	8

TABLE 2.3 – Comparaison des restaurations par une PSF SI et une PSF SV (i.e. opérateur  $\tilde{H}$ ) pour des images simulées de microscopies confocale et à champ large.

**Comparaison avec la méthode RL-TV [Dey 2006] adaptée à un flou SV** Nous comparons notre méthode de restauration SV basée sur l'algorithme SGP à l'algorithme RLTV [Dey 2006] donnée par l'équation (2.29) adaptée à l'opérateur de flou SV (il suffit de remplacer dans cette équation l'opérateur SI  $H$  par l'opérateur SV  $\tilde{H}$ ). Une coupe axiale de l'image obtenue par cette méthode est présentée dans la figure 2.7 (e). Les lignes d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) passant par les centres des billes restaurées (cf. figure 2.6), montrent que la méthode RLTV aboutit pratiquement à la même solution que celle obtenue par l'algorithme SGP. Les valeurs de NMSE et SSIM présentées dans la table 2.4, montrent que la solution obtenue par SGP est légèrement meilleure. Néanmoins, les temps de calculs présentés dans cette table montrent une petite diminution de temps de calcul par SGP par rapport à RLTV.

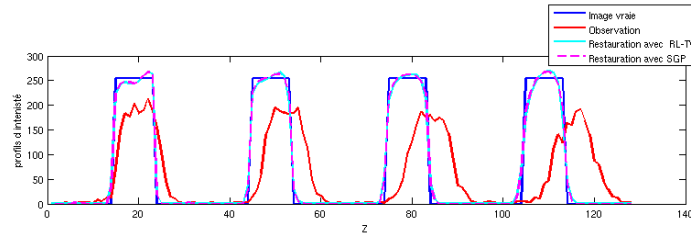


FIGURE 2.6 – Profils d'intensité passant par les centres des billes le long de l'axe ( $OZ$ ) de l'image originale (bleu), de l'image dégradée (rouge), de la restauration avec la méthode RLTV adaptée à un opérateur de flou SV  $\tilde{\tilde{H}}$  (bleu ciel), et de la restauration avec la méthode proposée utilisant l'algorithme SGP adaptée à l'opérateur  $\tilde{\tilde{H}}$  (rose).

Bruit	Poisson + opérateur SV		Gauss + opérateur SV	
Méthode	RLTV	SGP	Landweber	Fornasier et al.
NMSE moyen (%)	5.49	4.8234	32.05	32.02
SSIM moyen	0.9709	0.9746	0.745	0.746
Temps moyen (mn)	7.70	6.99	10	8

TABLE 2.4 – Comparaison des restauration par une PSF SI et une PSF SV (i.e. opérateur  $\tilde{\tilde{H}}$ ) pour des images simulées de microscopies confocale et à champ large.

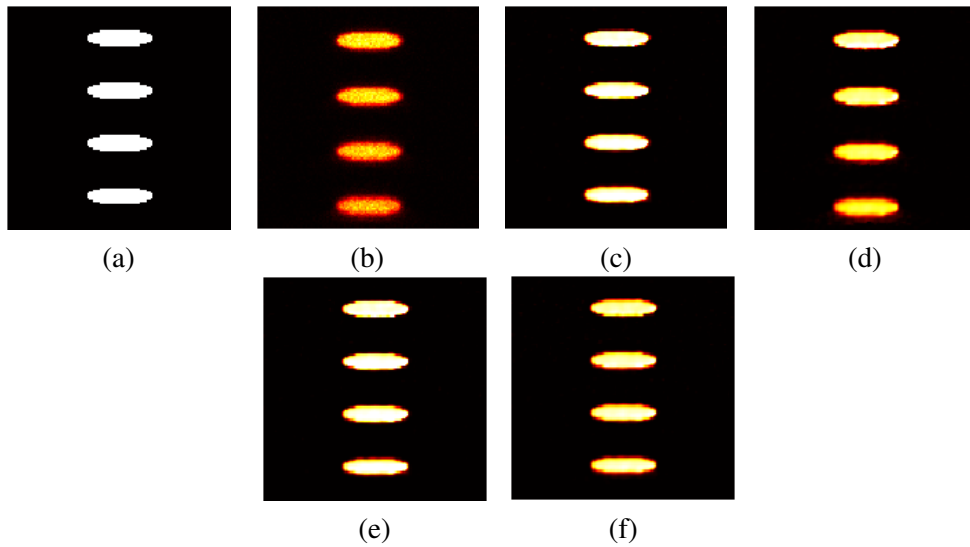


FIGURE 2.7 – Restauration d'une image simulée de CLSM avec un bruit de Poisson : Coupes ( $X,Z$ ) de l'objet originale (a) de l'observation (b), de la restauration avec la méthode proposée utilisant l'algorithme SGP adaptée à l'opérateur  $\tilde{\tilde{H}}$  (c), de la restauration avec une PSF SI (d), de la restauration avec l'algorithme RLTV adaptée à l'opérateur  $\tilde{\tilde{H}}$  (e), de la restauration avec la méthode EMMA (f).

### 2.5.1.3.b Test sur une image réelle de CLSM

Notre deuxième test est effectué sur une image réelle d'un objet fantôme : des billes fluorescentes de diamètre de  $100\text{nm}$  sont plongées dans le polymère d'IR approximatif de 1.45. L'échantillon préparé est observé avec un microscope confocal Zeiss LSM 510 équipé d'un objectif à immersion 100X (IR de 1.33) d'ouverture numérique 1.4. L'excitation est effectuée avec un Laser HeNe (longueur d'onde d'environ  $543\text{nm}$ ) et la détection est effectuée en utilisant un filtre passe-bande  $560 - 600\text{nm}$ . Les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement  $50\text{nm}$  et  $145\text{nm}$ . La projection du maximum d'intensité sur le plan  $(X, Z)$  de l'image enregistrée est présentée dans la figure 2.8 (a). Nous présentons également dans la figure 2.8 (d), le résultat de restauration avec une PSF SI prise juste au dessous de la lamelle. Les billes restaurées sont décalées par rapport à celles observées car la PSF SI considérée n'est pas centrée dans son volume à cause du changement d'IRs entre le milieu d'immersion (l'eau) et la lamelle (le verre). En effet, le système considéré est à trois couches : milieu d'immersion, lamelle et spécimen. Nous remarquons un léger décalage des billes restaurées par une PSF SV (cf. figure 2.8 (b)) par rapport à celles restaurées par une PSF SI grâce à la prise en compte des aberrations sphériques par la PSF SV. Le paramètre de régularisation est fixé à  $\alpha = 10^{-3}$  pour les deux restaurations (SI et SV).

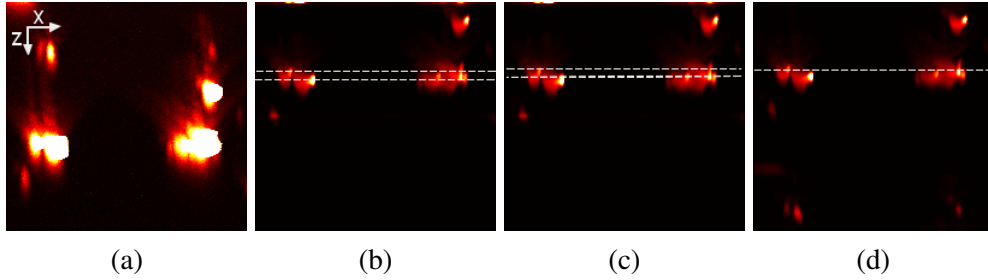


FIGURE 2.8 – Restauration d'une image réelle de CLSM : projections du maximum d'intensité sur le plan  $(X, Z)$  de l'observation (a), de la restauration avec l'opérateur  $\tilde{H}$  (b), de la restauration avec la méthode EMMA (c), de la restauration avec une PSF invariable (d).

## 2.5.2 Restauration en présence de bruit gaussien

Nous traitons ici des images contaminées par un bruit additif gaussien, comme celles issues d'un système de microscopie à champ large à cause de la forte luminosité. Comme nous l'avons fait dans la sous-section précédente, nous minimisons une fonctionnelle d'énergie comportant une régularisation de variation totale, le terme d'attache aux données lié à la statistique de bruit gaussienne étant quadratique :

$$J(f) = \left\| \tilde{H}(f) - g \right\|_2^2 + 2\alpha \|\nabla f\|_1 \quad (2.64)$$

Différentes méthodes peuvent être appliquées afin de minimiser ce critère. Nous citons par exemple l'algorithme classique de descente de gradient [Dey 2006], l'algorithme de direc-

tion alternée (basé sur les multiplicateurs de Lagrange) [Lantéri 2002], l'algorithme primal-dual [Chambolle 2011]. Étant donné le gros volume de données traité, nous cherchons à appliquer des algorithmes d'optimisation rapides. Parmi les méthodes d'optimisation rapides, nous avons retenu celle proposée dans [Fornasier 2009a]. Cette technique, fondée sur une stratégie de décomposition de domaine, permet d'effectuer des traitements en parallèle sur un processeur multi-coeurs. Elle a été appliquée avec succès pour les problèmes de déconvolution et "inpainting" d'image tout en assurant un temps de calcul faible. Nous proposons de l'adapter au problème de restauration avec l'opérateur de flou  $\tilde{H}$ . Pour ce faire, nous présentons tout d'abord cette méthode de Fornasier et al. et nous vérifions ses propriétés de convergence pour l'opérateur SV. Nous présentons enfin des résultats et des comparaisons avec la méthode SGP sur des images simulées et réelles de microscopie de fluorescence.

### 2.5.2.1 Algorithme de Fornasier et al. pour la restauration SV

Nous décrivons ici l'algorithme de Fornasier et al. proposé pour minimiser une fonctionnelle de type 2.64 dans laquelle l'opérateur de flou est SI. Nous présentons ici la méthode pour l'opérateur SV proposé. L'idée de cette méthode est de réduire la complexité de calcul par décomposition du problème en des sous-problèmes de taille plus réduite et les traiter d'une manière parallèle. En d'autres termes, au lieu de minimiser la fonctionnelle  $J(f)$  sur le domaine  $\mathcal{J}^d$ , la minimiser sur des sous-domaines  $\mathcal{J}_i^d$  de  $\mathcal{J}^d$  tels que :

$$\mathcal{J}_i^d \subset \mathcal{J}^d, 1 \leq i \leq D, \mathcal{J}_i^d \cap \mathcal{J}_{i+1}^d \neq \emptyset, \text{ et } \mathcal{J}^d = \bigcup_{1 \leq i \leq D} \mathcal{J}_i^d \quad (2.65)$$

C'est-à-dire,  $\mathcal{J}^d$  est divisé en  $D$  sous-domaines tels que les sous-domaines adjacents se chevauchent. Le chevauchement des sous-domaines ne permet que de simplifier la preuve de convergence de la méthode que nous traitons plus tard dans le cadre de l'opérateur SV  $\tilde{H}$ . Une méthode similaire où les sous-domaines ne se recouvrent pas est présentée dans [Fornasier 2009b]. Par souci de clarté, nous présentons la méthode pour une décomposition en deux sous-domaines  $\mathcal{J}_1^d$  et  $\mathcal{J}_2^d$  (cf. figure 2.9 (a)). La méthode est facilement généralisable à plusieurs sous-domaines. L'image à estimer  $f$  peut être décomposée comme suit :

$$f(x) = \begin{cases} f_1(j) & \text{si } j \in \mathcal{J}_1^d \setminus \mathcal{J}_2^d \\ f_1(j) + f_2(j) & \text{si } j \in \mathcal{J}_1^d \cap \mathcal{J}_2^d \\ f_2(j) & \text{si } j \in \mathcal{J}_2^d \setminus \mathcal{J}_1^d \end{cases} \quad (2.66)$$

Notons  $\mathcal{F}^d$  l'ensemble des fonctions à variables dans  $\mathcal{J}^d$  et à valeur dans  $\mathbb{R}^+$ . Soit  $\mathcal{V}_i = \{f \in \mathcal{F}^d, \text{supp}(f) \subset \mathcal{J}_i^d\}$ ,  $i \in \{1, 2\}$ , par  $\Gamma_1$  l'interface entre  $\mathcal{J}_1^d$  et  $\mathcal{J}_2^d \setminus \mathcal{J}_1^d$  et par  $\Gamma_2$  l'interface entre  $\mathcal{J}_2^d$  et  $\mathcal{J}_1^d \setminus \mathcal{J}_2^d$  (cf. figure 2.9 (a)). La résolution du problème d'optimisation globale se ramène à la résolution de chacun des problèmes suivants séparément pour ensuite combiner les résultats par l'équation (2.66) :

$$\begin{cases} \hat{f}_1 = \arg \min_{f_1 \in \mathcal{V}_1 / Tr|_{\Gamma_1} f_1 = 0} J(f_1 + f_2) \\ \hat{f}_2 = \arg \min_{f_2 \in \mathcal{V}_2 / Tr|_{\Gamma_2} f_2 = 0} J(f_1 + f_2) \end{cases} \quad (2.67)$$

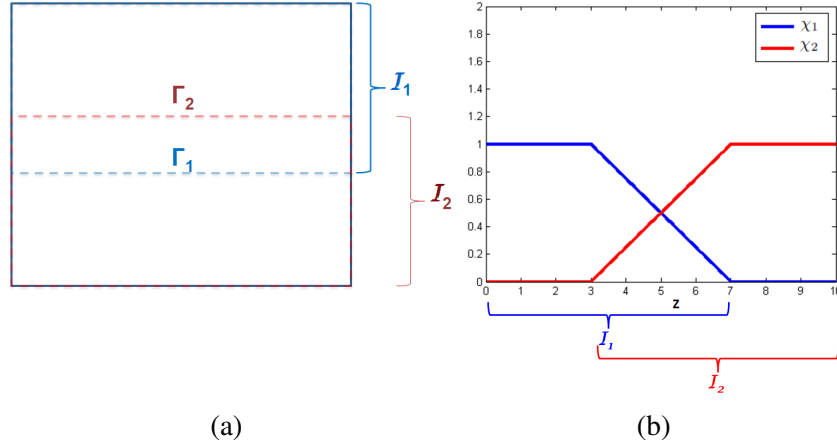


FIGURE 2.9 – (a) Décomposition du domaine de l'image en deux sous-domaines recouvrant, (b) exemple de variation des fonctions de  $\chi_1$  et  $\chi_2$  suivant la direction de décomposition, suivant l'axe ( $OZ$ ) dans nos tests.

où  $Tr|_{\Gamma_i} f_i = f_i|_{\Gamma_i}$ ,  $i = 1, 2$  est la restriction de la fonction  $f_i$  sur la frontière  $\Gamma_i$ . Considérons par exemple le problème de minimisation par rapport à la variable  $f_1$ . La principale difficulté de ce problème est de trouver un algorithme d'optimisation approprié permettant de préserver la contrainte  $f_1 \in \mathcal{V}_1 / Tr|_{\Gamma_1} f_1 = 0$ . En effet, en raison d'une telle condition, les méthodes de minimisation classiques fondées sur un schéma de descente de gradient ne sont pas directement applicables. Dans la méthode proposée dans [Fornasier 2009a], la fonctionnelle à minimiser  $J(\cdot)$  est remplacée par une fonctionnelle auxiliaire  $J^{s1}(\cdot)$  :

$$J^{s1}(f_1 + f_2, f_1^{(l)}) = J(f_1 + f_2) + \left\| f_1 - f_1^{(l)} \right\|_2^2 - \left\| \ddot{H}(f_1 - f_1^{(l)}) \right\|_2^2 \quad (2.68)$$

avec  $f_1, f_1^{(l)} \in \mathcal{V}_1$ ,  $f_2 \in \mathcal{V}_2$ . L'avantage de cette fonctionnelle est qu'elle peut s'écrire sous la forme suivante où la variable  $f_1$  n'est plus affectée par l'action de l'opérateur  $\ddot{H}$  :

$$J^{s1}(f_1 + f_2, f_1^{(l)}) = \|f_1 - z_1\|_2^2 + 2\alpha \left\| \nabla(f_1 + f_2) \right\|_{\mathcal{J}_1^d} \quad (2.69)$$

avec  $z_1 = f_1^{(l)} + \left( \ddot{H}^* \left( g - \ddot{H}(f_2) - \ddot{H}(f_1^{(l)}) \right) \right) | \mathcal{J}_1^d$  où  $\ddot{H}^*$  est l'opérateur adjoint de  $\ddot{H}$ . Ceci permettra le calcul rapide d'une solution du problème grâce au théorème suivant qui est démontré dans [Fornasier 2009a] :

**Théorème 1.** Les deux instructions suivantes sont équivalentes :

1.  $\hat{f}_1 = \underset{f_1 \in \mathcal{V}_1 / Tr|_{\Gamma_1} f_1 = 0}{\text{Arg Min}} \|f_1 - z_1\|_2^2 + 2\alpha \left\| \nabla(f_1 + f_2) \right\|_{\mathcal{J}_1^d}$ ,
2.  $\exists \eta \in \mathcal{V}_1$  avec  $\text{supp}(\eta) = \Gamma_1$  tel que :

$$\hat{f}_1 = (I - P_{\alpha K})(z_1 + f_2 - \eta) - f_2 \text{ et } Tr|_{\Gamma_1} \hat{f}_1^* = 0 \quad (2.70)$$

où  $P_{\alpha K}(f) = \underset{v \in K}{\text{Arg Min}} \|f - v\|_2$  est la projection orthogonale de  $f \in \mathcal{F}^d$  sur l'ensemble convexe fermé suivant :

$$K = \left\{ \text{div } p : p \in \left( \mathcal{F}^d \right)^3 \text{ tel que } |p(j)|_\infty \leq 1, \forall u \in \mathcal{J}^d \right\} \quad (2.71)$$

où la norme  $|\mathbf{a}|_\infty$  pour  $\mathbf{a} = (a_i)_{1 \leq i \leq 3} \in \mathbb{R}^3$  est définie comme suit :

$$|\mathbf{a}|_\infty = \max \{ |a_i|, 1 \leq i \leq 3 \} \quad (2.72)$$

Le calcul numérique de la projection sur  $K$  peut se faire par une méthode de Chambolle décrite dans [Chambolle 2004]. Ainsi, une solution  $f_1$  du problème de minimisation est accessible en utilisant l'équation (2.70) du théorème ci-dessus. Dans cette équation, la variable  $\eta$  est un point fixe de l'équation suivante comme montré dans [Fornasier 2009a] :

$$\eta = (Tr|_{\Gamma_1})^* Tr|_{\Gamma_1} (z_1 + P_{\alpha K}(\eta - (z_1 + f_2))) \quad (2.73)$$

Après avoir présenté les instructions de résolution du problème de minimisation locale, nous nous intéressons maintenant au problème de minimisation globale pour l'estimation de  $f$  sur tout le domaine  $\mathcal{J}^d$ . Celui-ci consiste à alterner entre les minimisations locales d'une manière séquentielle ou parallèle si l'on veut gagner en temps de calcul, ensuite combiner les solutions obtenues sur chacun des sous-domaines par l'équation (2.66). Nous présentons une version parallèle de l'algorithme global (cf. algorithme 3). Les fonctions  $\{\chi_1, \chi_2\} \subset \mathcal{F}^d$  utilisées dans l'étape 4 de cet algorithme permettent d'assurer le fait que les séquences  $\left( \tilde{f}_1^{(n)} \right)_{n \in \mathbb{N}}$  et  $\left( \tilde{f}_2^{(n)} \right)_{n \in \mathbb{N}}$  soient bornées ainsi que l'existence d'une décomposition optimale utilisée dans la preuve de convergence de la méthode proposée [Fornasier 2009a]. Elles doivent vérifier les conditions suivantes :

1.  $Tr|_{\Gamma_i} \chi_i = 0$  for  $i = 1, 2$ ,
2.  $\chi_1 + \chi_2 = 1$ ,
3.  $\text{supp}(\chi_i) \subset \mathcal{J}_i^d$  for  $i = 1, 2$ ,
4.  $\text{Max} \{ \|\chi_1\|_\infty, \|\chi_2\|_\infty \} < \infty$ .

Un exemple de variation des fonctions  $\chi_1$  et  $\chi_2$  suivant la direction de décomposition est présentée dans la figure 2.9 (b) : elles varient linéairement dans la zone de recouvrement et sont constantes ailleurs, de sorte que leur somme soit égale à 1 en tout point du domaine  $\mathcal{J}^d$ .

Les nombres d'itérations  $N$ ,  $L$  et  $I$  sont fixés à des valeurs élevées afin d'atteindre l'optimum global (e.g.  $L = I = 50$ ,  $N = 500$ ). Néanmoins, on peut utiliser un critère d'arrêt, comme par exemple la stabilité de l'estimée au sens de l'erreur quadratique moyenne i.e. l'erreur relative  $\frac{\|f^{(n)} - f^{(n+1)}\|_2}{\|f^{(n)}\|_2}$  est inférieure à un seuil fixé.

L'opérateur  $\tilde{H}(\cdot)$  doit vérifier certaines conditions afin de ne pas violer les propriétés de convergence établies dans [Fornasier 2009a]. Nous discutons ceci dans le paragraphe suivant.

**Algorithme 3** Version parallèle de l'algorithme de minimisation

- Initialiser  $f^{(0)} = \tilde{f}_1^{(0)} + \tilde{f}_2^{(0)}$ , (e.g.  $\tilde{f}_1^{(0)} = 0, \tilde{f}_2^{(0)} = 0$ )
- Initialiser le nombre d'itérations de l'algorithme global  $N$ ,
- Initialiser le nombre d'itérations des algorithmes de minimisation locales  $L$  et  $I$ ,
- Initialiser le paramètre de régularisation  $\alpha$ ,
- Pour  $n$  de 0 à  $(N - 1)$ , itérer les étapes suivantes :

**Étape 1 :** Minimisation de l'énergie dans le sous-domaine  $\mathcal{J}_1^d$

- Initialiser  $f_1^{(n+1,0)} = \tilde{f}_1^{(n)}$ ,
- Pour  $l$  de 0 to  $(L - 1)$ , itérer l'équation suivante :

$$f_1^{(n+1,l+1)} = \arg \min_{f_1 \in \mathcal{Y}_1 / Tr|_{\Gamma_1} f_1 = 0} J^{s1} \left( f_1 + \tilde{f}_2^{(n)}, f_1^{(n+1,l)} \right) \quad (2.74)$$

**Étape 2 :** Minimisation de l'énergie dans le sous-domaine  $\mathcal{J}_2^d$

- Initialiser  $f_2^{(n+1,0)} = \tilde{f}_2^{(n)}$
- Pour  $i$  de 0 à  $(I - 1)$ , itérer l'équation suivante :

$$f_2^{(n+1,i+1)} = \arg \min_{f_2 \in \mathcal{Y}_2 / Tr|_{\Gamma_2} f_2 = 0} J^{s2} \left( \tilde{f}_1^{(n)} + f_2, f_2^{(n+1,i)} \right) \quad (2.75)$$

**Étape 3 :**  $f^{(n+1)} = \frac{f_1^{(n+1,L)} + f_2^{(n+1,I)} + f^{(n)}}{2}$

**Étape 4 :**  $\begin{cases} \tilde{f}_1^{(n+1)} = \chi_1 \cdot f_1^{(n+1)} \\ \tilde{f}_2^{(n+1)} = \chi_2 \cdot f_2^{(n+1)} \end{cases}$

**2.5.2.2 Convergence pour la fonctionnelle (2.64)**

À partir de la preuve de convergence établie dans [Fornasier 2009a] pour un opérateur linéaire appliqué sur  $f$ , nous tirons deux conditions nécessaires que nous vérifions pour l'opérateur SV  $\tilde{\tilde{H}}$  :

**Première condition :** coercivité de la fonctionnelle à minimiser  $J(\cdot)$ .

**Définition 3.** La fonctionnelle  $J(\cdot)$  est dite coercive si :  $\lim_{\|f\| \rightarrow +\infty} J(f) = +\infty$ .

Cette condition permet de garantir l'existence d'un minimum de la fonctionnelle  $J(\cdot)$ . Cette condition permet de garantir aussi le fait que toute suite  $(f^{(n)})_{n \in \mathbb{N}}$  minimisante de  $J(\cdot)$  est bornée, ce qui permet d'extraire une sous-suite convergente.

D'après la proposition 3.1 de [Vese 2001], pour montrer la coercivité de la fonctionnelle (2.64), il suffit de montrer que  $f = 1 \notin \text{Ker}(\tilde{\tilde{H}}) = \{f \in \mathcal{F}^d, \tilde{\tilde{H}}(f) = 0\}$ . Ce résultat

découle immédiatement de la positivité des fonctions de pondération et  $\sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(j) = 1, \forall j \in \mathbb{N}^3$  ainsi que la positivité et la normalisation des PSFs  $h^i$ .

**Deuxième condition :**  $\|\ddot{H}\|_2 < 1$ .

La norme  $\|H\|_2$  pour  $H : \mathcal{F}^d \rightarrow \mathcal{F}^d$ , qu'il soit SI ou SV est définie comme suit :

$$\begin{aligned} \|H\|_2 &= \max_{f \in \mathcal{F}^d \setminus \{0\}} \frac{\|H(f)\|_2}{\|f\|_2} \\ &= \sup \{ \|H(f)\|_2 \text{ tel que } \|f\|_2 \leq 1 \} \end{aligned}$$

Cette condition permet d'obtenir les deux propriétés suivantes utilisées dans la preuve de convergence de la séquence  $(f^{(n)})_{n \in \mathbb{N}}$  produite par l'algorithme de Fornasier et al :

1.  $J(f^{(n)}) > J(f^{(n+1)}), \forall n \in \mathbb{N}, f^{(n)} \neq f^{(n+1)}$
2.  $\lim_{n \rightarrow \infty} \|f^{(n+1)} - f^{(n)}\|_2 = 0$ .

Comme  $\|\ddot{H}\|_2 = \|\ddot{H}^*\|_2$ , il suffit de montrer que  $\|\ddot{H}^*\|_2 < 1$ .

Tout d'abord, vérifions cette propriété pour un opérateur SI  $H(\cdot) = h * \cdot$  :

Considérons l'écriture matricielle associée à l'opération de convolution stationnaire  $Hf$ ,  $H \in \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^n$  étant une matrice circulante. En utilisant la propriété de diagonalisation par transformée de Fourier discrète normalisée, nous obtenons  $\|H\|_2 = \|\Lambda\|_2$ , où  $\Lambda = \text{diag}\{\lambda_i, i = 1, \dots, n\}$ ,  $n = \text{Card}(\mathcal{J}^d)$ , est la matrice diagonale et  $\lambda_i$  sont les valeurs propres de  $H$ . Nous pouvons montrer que  $\|\Lambda\|_2$  est bornée supérieurement par la valeur propre maximale  $\lambda_{\max}$ . Comme nous considérons des PSFs normalisées, nous avons  $\lambda_{\max} = \frac{1}{\sqrt{n}}$  puisque celle-ci est calculée comme la transformée de Fourier discrète normalisée de zéro. Ainsi, nous obtenons  $\|H\|_2 \leq \frac{1}{\sqrt{n}}$  ou encore  $\|H\|_2 < 1, \forall n > 1$ .

Maintenant, nous montrons cette propriété dans le cas de l'opérateur SV (i.e.  $\|\ddot{H}\|_2 \leq 1$ ). Soit  $f \in \mathcal{F}^d$  tel que  $\|f\|_2 \leq 1$ . Nous avons :

$$\|\ddot{H}(f)\|_2 \leq \sqrt{n} \|\ddot{H}(f)\|_\infty. \quad (2.76)$$

Il suffit alors de montrer que  $\|\ddot{H}(f)\|_\infty \leq \frac{1}{\sqrt{n}}$ . Nous avons :

$$\begin{aligned} \|\ddot{H}(j)\|_\infty &= \sup_{j \in \mathcal{J}^d} \left| \left[ \ddot{H}(f) \right] (j) \right| \\ &= \sup_{j \in \mathcal{J}^d} \sum_{i=1}^M |\psi^i(j) \cdot H^i(f)(j)| \\ &\leq \sup_{j \in \mathcal{J}^d} \sum_{i=1}^M |\psi^i(j)| \cdot |H^i(f)(j)| \end{aligned}$$



Comme  $\forall j \in \mathcal{J}^d$ ,  $\sum_{i=1}^M \psi^i(j) = 1$ , et  $\left| H^{i*}(f)(j) \right| \leq \frac{1}{\sqrt{n}}$ , nous obtenons :

$$\|\tilde{H}(f)\|_{\infty} \leq \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (2.77)$$

Ainsi, à partir des équations (2.76) et (2.77), nous obtenons :

$$\|\tilde{\tilde{H}}\|_2 = \|\tilde{H}\|_2 \leq 1 \quad (2.78)$$

L'inégalité stricte est obtenue à un facteur d'échelle près. Par conséquent, en vérifiant ces deux propriétés, nous pouvons conclure que l'algorithme converge pour l'opérateur  $\tilde{\tilde{H}}$  pour les mêmes arguments présentés dans [Fornasier 2009a].

**Remarque 7.** *Le nombre de sous-domaines  $D$  utilisé dans la méthode d'optimisation est indépendant du nombre de PSFs  $M$  utilisé dans l'approximation. Augmenter le nombre  $D$  permet de réduire le temps de calcul en effectuant  $D$  traitements en parallèle tandis qu'augmenter le nombre  $M$  permet d'améliorer la précision de l'approximation tout en augmentant le temps de calcul. Il est possible de choisir  $D = M$  et d'associer une PSF  $h^i$  à chaque sous-domaine  $\mathcal{J}_i^d$ . Ceci permettra de ne tenir compte qu'au plus de trois PSFs par zone (l'interpolation de  $h^{i-1}$ ,  $h^i$ , et  $h^{i+1}$ ), ce qui peut réduire davantage le temps de calcul. Il est également possible de paralléliser l'opération de dégradation (2.34), ce qui permettra d'augmenter le nombre de PSFs  $M$  sans augmenter considérablement le temps de calcul. En effet, il suffit d'effectuer  $M$  convolutions en parallèle (dans la limite des capacités de calcul de la machine) par les différentes PSFs  $h^i$  des images  $\psi^i.f$ .*

### 2.5.2.3 Tests et comparaison

Nous présentons des résultats sur des images simulées et réelles de microscopie de fluorescence. Nous les comparons tout d'abord à ceux obtenus par une PSF SI en appliquant l'algorithme de Fornasier et al. Ensuite, nous comparons l'algorithme de Fornasier à un autre algorithme d'optimisation, l'algorithme de Landweber adapté au critère (2.64).

#### 2.5.2.3.a Test sur une image simulée microscopie à champ large

**Simulations des données :** Nous considérons la même image de billes utilisée dans le test précédent (cf. figure 2.10 (a)). Nous y ajoutons un flou en utilisant 128 PSFs d'une microscopie à champ large, chacune correspondant à une profondeur donnée du volume de l'objet, les mêmes caractéristiques que le système optique précédent (cf. paragraphe 2.5.1.3.a) sont considérées (ouverture numérique, grossissement, ...). Nous ajoutons à cette image une constante de bruit de fond  $b_g = 10^{-8}$  et un bruit gaussien de moyenne nulle et de variance 0.36. L'image obtenue ayant un rapport signal sur bruit d'environ 20dB est présentée sur la figure 2.10 (a).

**Test et comparaison avec la restauration SI :** Nous appliquons à cette image l'algorithme de Fornasier et al. proposé en considérant un découpage de l'image en deux sous-domaines suivant l'axe ( $OZ$ ). Nous utilisons une combinaison de 7 PSFs pour la restauration. Le paramètre de régularisation est fixé à  $\alpha = 5 \cdot 10^{-3}$ . Le résultat obtenu est présenté dans la figure 2.10 (c). Celui-ci semble meilleur que celui obtenu par une PSF invariable calculée à une profondeur nulle (cf. figure 2.10 (d)). Ceci est confirmé par la figure 2.11 présentant les lignes d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) en passant à travers les centres des billes. Dans la table 2.3, nous donnons les mesures de qualités et les temps de calcul pour ces tests.

**Comparaison avec la méthode de Landweber [LAndwEbER 1951] adaptée à un flou SV :** Nous proposons de comparer notre méthode à la restauration par l'algorithme de Landweber [LAndwEbER 1951] adaptée à l'opérateur de flou SV. Nous utilisons alors l'itération de minimisation de l'équation (2.27) dans laquelle l'opérateur de flou SV  $H$  est remplacé par l'opérateur SV  $\tilde{H}$ . Cet algorithme aboutit pratiquement à la même solution (cf. figure 2.10 (e)) que celle obtenue par l'algorithme de Fornasier mais en un temps de calcul plus élevé (cf. table 2.4).

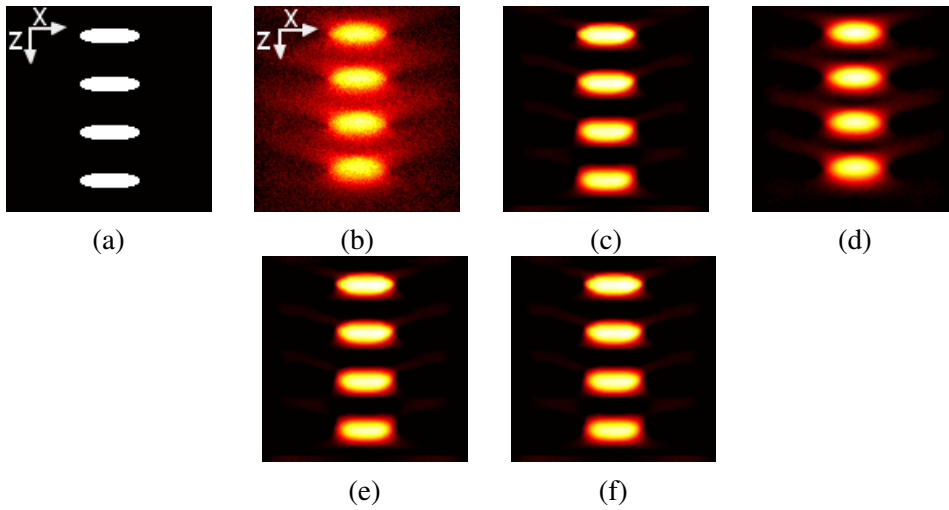


FIGURE 2.10 – Restauration d'une image simulée de microscopie à champ large (avec un bruit gaussien) : Coupes ( $X, Z$ ) de l'objet originale (a) de l'observation (b), de la restauration avec la méthode proposée utilisant l'algorithme de Fornasier adaptée à l'opérateur  $\tilde{H}$  (c), de la restauration avec une PSF SI (d), de la restauration avec l'algorithme de Landweber adaptée à l'opérateur  $\tilde{H}$  (e), de la restauration avec la méthode EMMA (f).

### 2.5.2.3.b Test sur une image réelle

Nous testons la méthode proposée sur une image réelle d'une cellule de plante de muguet (*Convallaria majalis*) observée par un microscope confocal Zeiss LSM 510 équipé d'un objectif à immersion 40X (IR d'environ 1.5) et d'ouverture numérique 1.3, le diamètre

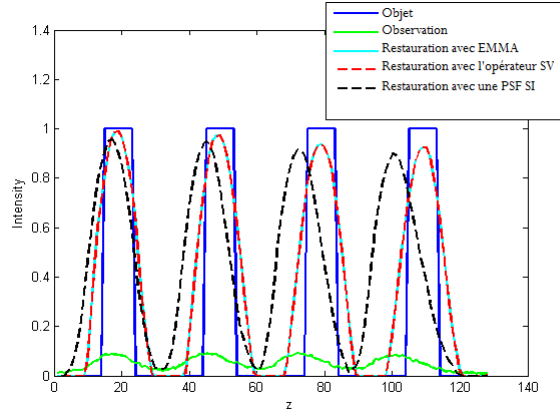


FIGURE 2.11 – Profils d'intensité passant par les centres des billes le long de l'axe ( $OZ$ ) de l'image originale (bleu), de l'image dégradée (vert), de la restauration avec la méthode EMMA (bleu ciel), et de la restauration avec l'opérateur  $\hat{H}$  (rouge) et de la restauration avec une PSF SI (noir).

du sténopé (pinhole) est de l'ordre de  $3AU$ . L'excitation est effectuée par un Laser HeNe (longueur d'onde d'environ  $543nm$ ) et la détection est effectuée en utilisant un filtre passe-bande  $560 - 600nm$ . Les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement  $50nm$  et  $140nm$ . Les projections du maximum d'intensité sur les plans  $(X, Y)$  et  $(X, Z)$  de l'image enregistrée sont présentées dans les figures 2.12 (a) et (e). Les résultats de restauration avec la méthode proposée sont présentés dans les figures 2.12 (b) et (f), et ceux obtenus avec une seule PSF SI prise au milieu de l'échantillon sont présentés dans les figures 2.12 (d) et (h)). Pour ces tests, le paramètre de régularisation est fixé à  $\alpha = 10^{-3}$ . Il est difficile de comparer les résultats dans le cas d'images réelles.

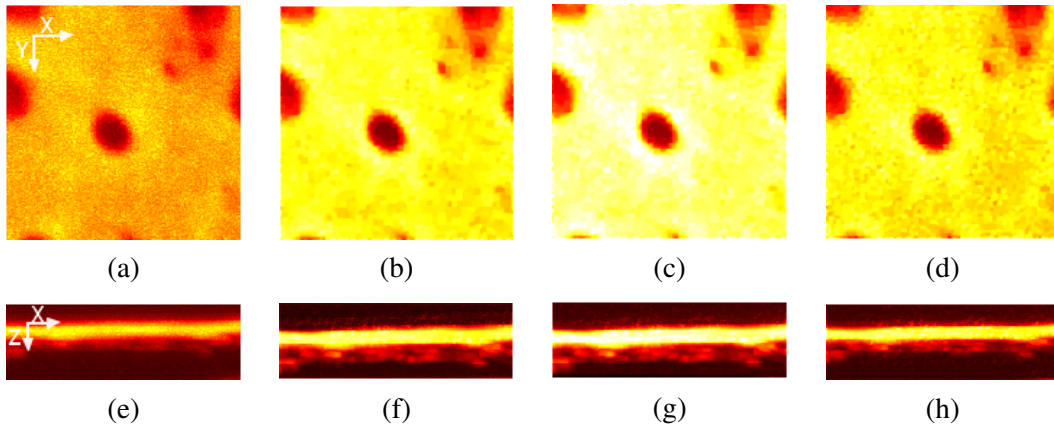


FIGURE 2.12 – Les projections du maximum d'intensité sur les plans  $(X, Y)$  et  $(X, Z)$  de ((a) et (e)) l'image observée, ((b) et (f)) l'image restaurée par la méthode proposée, ((c) et (g)) image restaurée par la méthode EMMA, et ((d) et (h)) l'image restaurée par une PSF SI prise au milieu de l'échantillon.

## 2.6 Comparaison sur la restauration SV

Nous proposons de comparer notre approche de restauration à l'une des méthodes de l'état de l'art, il s'agit de la méthode EMMA ("Enhanced Merging Masks Algorithm") [Maalouf 2010]. L'idée de cette méthode est d'effectuer des déconvolutions multiples (par n'importe quel algorithme de déconvolution) sur la totalité de l'image, chacune avec une PSF différente  $h^i, i = 1, \dots, M$ , conduisant ainsi à un ensemble d'images déconvoluées  $\{f^1, \dots, f^M\}$ . Celles-ci sont ensuite fusionnées en utilisant des fonctions de pondération  $\{\psi^1, \dots, \psi^M\}$  comme suit :  $f(j) = \sum_{i=1}^M \psi^i(j) \cdot f^i(j)$ ,  $j \in \mathbb{N}^3$ , ce qui permet de lisser les transitions entre les régions de l'image. Les étapes de cette méthode sont résumées dans la figure 2.13 (a)). Nous la comparons à notre approche (où un opérateur de flou SV est utilisé dans la procédure d'inversion, cf. figure 2.13 (b)), en terme de précision de reconstruction, de temps de calcul et de facilité de mise en oeuvre. Pour ce faire, nous reprenons les images simulées et réelles utilisées dans la section précédente. Nous leur appliquons l'algorithme EMMA et calculons les mesures de NMSE et SSIM entre l'image restaurée et l'image originale pour 30 réalisations de bruit de poisson dont la moyenne et la variance sont données par la même image floue (cf. table 2.5).

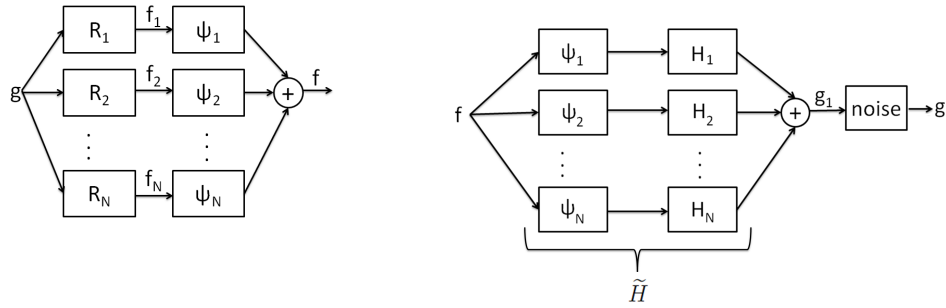


FIGURE 2.13 – (a) Principe de la restauration SV en utilisant la méthode EMMA.  $R_i, i = 1, \dots, M$  désigne la restauration avec une PSF SI  $h_i$ , (b) Principe de la restauration SV proposée : approcher l'opérateur de flou SV  $\tilde{H}$  et l'utiliser dans la procédure de restauration.

### 2.6.1 Comparaison dans le cas d'une statistique de bruit poissonnienne

Nous considérons tout d'abord l'image simulée de billes de la figure 2.7 (a). Nous lui appliquons l'algorithme EMMA dans lequel les déconvolutions par une PSF SI sont effectuées par l'algorithme SGP proposé. Nous présentons dans la figure 2.7 (f) une coupe axiale de l'image obtenue et dans la figure son profil d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ). Ces résultats ainsi que les valeurs de NMSE et SSIM données dans la table 2.5 montrent que notre méthode est plus précise et plus rapide que la méthode EMMA. Néanmoins, la méthode EMMA peut être facilement parallélisée grâce à l'indépendance entre les algorithmes de déconvolution mis en oeuvre.

Nous présentons également dans la figure 2.8 (c), un résultat de restauration par la méthode EMMA sur l'image réelle de microscopie confocale (figure 2.8 (a)). Celui-ci est

comparable à celui obtenu par notre méthode.

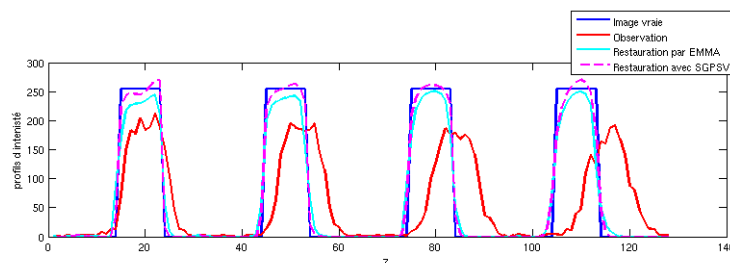


FIGURE 2.14 – Profils d’intensité passant par les centres des billes le long de l’axe ( $OZ$ ) de l’image originale (bleu), de l’image dégradée (rouge), de la restauration avec la méthode EMMA (bleu ciel), et de la restauration avec l’opérateur  $\tilde{H}$  (rose).

## 2.6.2 Comparaison dans le cas d’une statistique de bruit gaussienne

Nous considérons l’image simulée de microscopie à champ large présentée dans la figure 2.10 (b). Nous appliquons à celle-ci l’algorithme EMMA dans lequel les déconvolutions SI sont effectuées par la méthode de Fornasier et al. L’image restaurée (cf. figure 2.10 (f)), les lignes d’intensité le long de l’axe ( $OZ$ ) passant par les centres des billes (cf. figure 2.11), ainsi que les mesures NMSE et SSIM (cf. table 2.5) montrent que la méthode EMMA offre pratiquement la même précision que notre méthode de restauration. Ceci est dû au fait que l’erreur de l’approximation du flou SV est dominée par l’erreur engendrée par l’inversion et le mauvais conditionnement. En effet, dans ce test, nous avons utilisé un flou beaucoup plus important que dans le test précédent en microscopie confocale, afin de simuler un cas réaliste d’un microscope à champ large. Néanmoins, notre méthode est beaucoup plus rapide que la méthode EMMA. Enfin, nous présentons dans les figures 2.12 (c) et (g) le résultat de restauration de l’image réelle de cellules de plante de muguet de par la méthode EMMA, celui-ci n’est pas très loin du résultat obtenu par notre méthode.

Bruit	Poisson		Gauss	
Méthode	SGP (SV)	EMMA	Fornasier et al (SV)	EMMA
NMSE moyen (%)	4.8234	7.8418	32.02	32.22
SSIM moyen	0.9746	0.9541	0.743	0.746
Temps moyen (mn)	6.99	18.76	8	25

TABLE 2.5 – Comparaison des méthodes de restauration EMMA et la restauration avec l’opérateur  $\tilde{H}$  pour des images simulées de microscopies confocale et à champ large.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la restauration non-aveugle des images de microscopie de fluorescence prenant en compte la variabilité du flou en profondeur. Nous avons étudié les modèles d'approximation du flou SV. Nous avons montré qu'un modèle dans lequel la PSF SV est approchée par une combinaison convexe de PSFs SI prises à quelques profondeurs, est une bonne approximation du modèle théorique continuellement variable en profondeur. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'estimation de l'image nette par l'inversion de ce modèle. Nous avons développé deux méthodes d'inversion. Nous avons adapté au problème de restauration avec une PSF 3D variable en profondeur, la méthode SGP [Bonettini 2009] en présence de bruit de Poisson (CLSM) et la méthode de Fornasier et al. [Fornasier 2009a] en présence de bruit gaussien (WFM).

Dans ces deux méthodes, la PSF variable en profondeur est supposée connue. Néanmoins, en pratique il est difficile de fixer la PSF malgré l'existence des modèles théoriques car ceux-ci dépendent de certains paramètres physiques inconnus (comme par exemple, l'IR du spécimen). Une méthode aveugle ou semi-aveugle doit alors être développée. Ceci fera l'objectif du chapitre suivant.

# Restauration aveugle

## Sommaire

<b>3.1</b>	<b>Problématique</b>	<b>88</b>
<b>3.2</b>	<b>État de l'art</b>	<b>89</b>
3.2.1	Déconvolution aveugle : flou SI	89
3.2.2	Restauration aveugle : flou SV	93
<b>3.3</b>	<b>Première méthode proposée : PSF non-paramétrée</b>	<b>95</b>
3.3.1	Notations	96
3.3.2	Critère MAPJ	96
3.3.3	Existence d'une solution	97
3.3.4	Résolution numérique	103
3.3.5	Tests expérimentaux	107
<b>3.4</b>	<b>Seconde méthode proposée : PSF paramétrée</b>	<b>115</b>
3.4.1	Régularisation de la PSF	116
3.4.2	Critère MAPJ et résolution numérique	120
3.4.3	Tests expérimentaux	121
3.4.4	Discussions et comparaisons	122
<b>3.5</b>	<b>Restauration aveugle avec contrainte de support sur l'objet</b>	<b>128</b>
3.5.1	Estimation non-paramétrique avec contrainte de support sur l'objet	128
3.5.2	Estimation paramétrique avec contrainte de support sur l'objet	132

## Introduction

En dépit de l'existence de modèle théorique pour le calcul de la PSF en microscopie de fluorescence, il est difficile d'obtenir avec précision une telle mesure. En effet, le modèle de PSF théorique dépend de certains paramètres d'acquisition qui sont inaccessibles en pratique comme par exemple l'IR du spécimen. Il est alors nécessaire de développer une méthode de restauration aveugle ou semi-aveugle dans laquelle la PSF variable en profondeur et l'objet sont conjointement estimés. Nous nous intéressons dans ce chapitre à ce problème d'estimation. Ce problème est particulièrement difficile car le nombre de variables inconnues est supérieur au nombre de variables connues (problème sous-déterminé). Malgré les nombreux travaux sur ce sujet, il reste encore un problème ouvert, notamment dans le cas d'un flou SV.

Nous proposons dans ce chapitre deux méthodes de restauration aveugle prenant en compte la variabilité du flou en profondeur. En fixant les fonctions de pondérations

$\psi^1, \dots, \psi^M$ , nous estimons conjointement l'image  $f$  et l'ensemble des PSFs  $h^1, \dots, h^M$  en suivant une approche par maximum a posteriori joint (MAPJ). Dans la première méthode, nous considérons un modèle de PSF non-paramétrique où les intensités des PSFs  $h^i$  sont estimées en chaque voxel. Cela conduit à un grand nombre de variables à estimer, mais présente l'avantage de laisser une grande liberté sur la forme de la PSF qui peut être plus ou moins déformée suivant le niveau d'aberration.

Dans la deuxième méthode, nous considérons des PSFs paramétrées par des fonctions gaussiennes (voir paragraphe 1.4.3). Ceci présente l'avantage de réduire considérablement le nombre de paramètres à estimer, ce qui réduit aussi l'espace des solutions possibles.

Nous décomposons ce chapitre en quatre sections : dans la première section, nous évoquons les difficultés d'un tel problème d'estimation aveugle. Nous présentons, dans la deuxième section, l'état de l'art sur la restauration aveugle dans un cadre de flou SI, puis dans un cadre de flou SV. Dans la troisième section, nous présentons notre première solution pour la restauration aveugle en utilisant des PSFs non-paramétrées. Nous présentons dans la section suivante notre deuxième solution pour la restauration aveugle dans laquelle les PSFs  $h^1, \dots, h^M$  sont paramétrées par des fonctions gaussiennes. Nous discutons et comparons ces deux approches d'estimation. Dans la dernière section, nous introduisons deux méthodes d'estimation avec une contrainte sur le support de l'objet qui peut être obtenue par un système de tomographie diffractive couplé avec la microscopie de fluorescence.

### 3.1 Problématique

Notre objectif est d'estimer à la fois la PSF SV  $\tilde{h}(j, j')$  et l'image  $f(j)$  uniquement à partir de l'observation  $g$  et quelques informations a priori. Ce problème est plus difficile que celui abordé dans le chapitre précédent. En effet, le nombre de variables inconnues passe de  $n$  pour une restauration non-aveugle à  $n^3$  pour une restauration aveugle. Grâce à l'approximation du flou SV que nous avons présentée dans le chapitre précédent, le nombre de variables à estimer se réduit à  $Mn^2$ , avec  $M$  le nombre de PSFs SI considérées dans l'approximation, les fonctions de pondérations étant fixées par l'utilisateur. Ainsi, plus le nombre de PSFs est grand, plus l'approximation du flou SV est bonne mais plus le problème est sous-déterminé. Il est alors important d'injecter le plus d'information possible sur les variables à estimer.

Par ailleurs, si le problème de restauration est mal-posé, le problème de restauration aveugle est doublement mal-posé, il est à la fois mal-posé par rapport à l'image et par rapport à la PSF. En effet, les trois conditions de Hadamard pour le problème d'estimation de  $(f, \tilde{h})$  à partir de  $g \sim N(\tilde{H}(f))$  ne sont généralement pas vérifiées : une solution  $(f, \tilde{h})$  peut ne pas exister [Katsaggelos 1991, Bertero 1998b]. Nous montrons cependant dans le paragraphe 3.3.3 l'existence d'une solution à un problème d'estimation que nous formulons pour des données entachées par un bruit poissonien.

En outre, l'unicité de la solution n'est également pas garantie. Nous notons par exemple ces solutions triviales dans le cas d'un flou SI (i.e.  $M = 1$ ) et des données non-bruitées  $g = h * f$  :



- $\hat{h} = \delta, \hat{f} = g$  (ou  $\hat{h} = g, \hat{f} = \delta$ ), avec  $\delta$  la distribution de Dirac,
- $\hat{h} = h_1, \hat{f} = h_2 * f$  (ou  $\hat{h} = h_2, \hat{f} = h_1 * f$ ) pour une fonction  $h$  réductible i.e.  $h = h_1 * h_2$  (des solutions similaires sont aussi obtenues pour  $f$  réductible),
- $\hat{h} = \frac{1}{\kappa} h, \hat{f} = \kappa f$  avec  $\kappa$  un scalaire positif,
- $\hat{h} = h(j - \mu), \hat{f} = f(j + \mu)$  avec  $\mu \in \mathcal{J}^d$ .

Les deux premiers types de solutions peuvent être évités en pénalisant les PSFs trop étroites. Nous utilisons plus tard une des techniques permettant d'éviter de telles solutions indésirables. Le troisième type de solutions peut être évité en imposant une contrainte de normalisation sur la PSF et/ou de conservation de flux sur l'image. Le dernier type de solutions est difficile à éviter sans disposer d'une forte contrainte sur la PSF et/ou sur la position de l'objet. Notons que ce type de solutions n'est pas traité dans la littérature et que souvent la PSF est supposée centrée. Nous introduisons dans la dernière section de ce chapitre une contrainte sur le support de l'objet permettant de réduire cette ambiguïté.

Enfin, nous notons que la troisième condition de Hadamard (i.e. dépendance de la solution d'une manière continu des données) n'est aussi pas assurée à cause de la sensibilité de la solution au bruit (voir section 2.1). Nous verrons dans la section suivantes comment les algorithmes existants ont abordé ce problème d'estimation difficile.

## 3.2 État de l'art

Nous présentons ici une classification des méthodes proposées dans la littérature pour la déconvolution aveugle, ensuite celles proposées pour la restauration aveugle dans un cadre de flou SV.

### 3.2.1 Déconvolution aveugle : flou SI

Les méthodes de déconvolution aveugle sont nombreuses et peuvent être classifiées différemment, suivant le type de bruit considéré, le cadre d'estimation Bayésien ou non-Bayésien, etc. Nous proposons une classification similaire à celle proposée dans [Kenig 2010], une classification suivant l'étape à laquelle l'estimation du flou est réalisée :

- méthodes d'identification a priori de la fonction de flou,
- méthodes d'estimation jointe de la fonction de flou et de l'image

Nous décrivons ici quelques unes de ces méthodes. Une étude plus complète se trouve par exemple dans [Campisi 2007, Levin 2009].

#### 3.2.1.1 Méthodes d'identification a priori de la fonction de flou

Dans cette classe de méthodes d'estimation, le flou est premièrement estimé séparément de l'objet. Ensuite, une fois une estimée de la PSF disponible, l'estimation de l'objet est effectuée en appliquant l'une des méthodes de déconvolution non-aveugle comme nous l'avons vu au chapitre précédent. Toute la difficulté est alors de trouver une méthode qui permet d'estimer le flou en absence de l'objet. Nous décrivons ici quelques unes de ces méthodes.

### 3.2.1.1.a Estimation à partir des zéros fréquentiels

Cette méthode est l'une des plus anciennes méthodes qui reste limitée à certaines applications où le flou peut être modélisé par une fonction paramétrée, complètement caractérisée par ses zéros dans l'espace de Fourier [Stockham Jr 1975, Cannon 1976] (comme par exemple le flou de bougé ou le flou de défocalisation dans une camera). Le problème est alors résolu dans l'espace fréquentiel en cherchant les zéros de l'image observée et les attribuant à la fonction de flou. Cette méthode est très sensible au bruit, ce qui limite son application aux données bruitées de microscopie de fluorescence.

### 3.2.1.1.b Estimation par marginalisation des variables cachées

Dans un cadre Bayésien, il est possible de se débarrasser des variables inconnues par marginalisation [Levin 2011, Blanco 2011]. Il s'agit d'estimer la PSF  $h$  en maximisant la probabilité a posteriori marginale suivante :

$$\begin{aligned}\hat{h} &= \arg \max_f Pr(h|g) \\ &= \arg \max_f \int Pr(h, f|g) Pr(f) df\end{aligned}\quad (3.1)$$

L'algorithme Espérance-Maximisation (EM) est très populaire pour la résolution de ce type de problème d'estimation. Néanmoins, une difficulté est son coût calculatoire qui rend son utilisation rédhibitoire pour des PSFs à support étendue, notamment en microscopie de fluorescence. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, il est possible de contourner ce problème par diagonalisation du noyau de convolution dans l'espace de Fourier si le modèle de bruit et les modèles d'a priori le permettent (e.g. des fonctions quadratiques). Notons que pour la même raison il est difficile d'appliquer directement cette méthode aux images en présence d'un bruit poissonien (le type de bruit qui existe dans les images de microscopie de fluorescence) sauf si une approximation quadratique du modèle poissonien est considérée [Stagliano 2011]. Ainsi, l'utilisation de ces méthodes pour la microscopie de fluorescence reste limitée principalement à cause de leur coût calculatoire important.

### 3.2.1.2 Méthodes d'estimation jointe de la fonction de flou et de l'image

Les méthodes d'estimation de cette classe estiment simultanément le flou et l'image. Nous les classifions suivant le cadre d'estimation, déterministe ou stochastique.

#### 3.2.1.2.a Méthodes déterministes

Les méthodes les plus anciennes de cette classe sont les méthodes dites *séparation des plages de zéros* ou encore *factorisation polynomiale* [Lane 1987]. L'idée est de factoriser la transformée en  $Z$  de l'image observée en deux facteurs convolutifs correspondant aux transformées en  $Z$  de l'image et de la PSF. Le problème revient à chercher les racines (les zéros) du polynôme de la transformée en  $Z$  de l'image. Cette factorisation n'est unique que

sous certaines conditions qui sont souvent non-vérifiées en pratique comme par exemple l'absence de bruit. Cette méthode ne peut donc être appliquée aux données bruitées de microscopie de fluorescence.

Une autre méthode déterministe est la méthode de projections successives sur des ensembles convexes ("*Projection onto Convex Sets*" (POCS) en anglais) [Youla 1982, Sezan 1982, Lam 1999]. L'idée est de formuler des contraintes sur les variables à estimer (l'image et la PSF) sous forme d'ensembles convexes (comme par exemple la contrainte donnée par le modèle de dégradation, la positivité, le support connu de la PSF et/ou de l'image, etc) et de les imposer d'une manière itérative sur l'image et la PSF.

Certains préfèrent formuler ces contraintes sous forme d'un critère d'optimalité et le minimiser d'une manière alternée, une fois par rapport à l'image et une fois par rapport à la PSF [Ayers 1988, Tsumuraya 1994, Kundur 1998]. Ce type d'algorithme est très courant et se retrouve sous le terme d'algorithme IBD ("*Iterative Blind Deconvolution*" en anglais). Le critère à minimiser s'écrit sous la forme suivante :

$$J(f, h) = J^d(f, h) + \alpha J_f^p(f) + \beta J_h^p(h) \quad (3.2)$$

Le terme  $J^d(f, h)$  est le terme d'attache aux données résultant de la vraisemblance de l'observation (modèle direct d'observation). Les deux termes  $J_f^p(f)$  et  $J_h^p(h)$  sont respectivement des termes de régularisation de l'image et de la PSF.  $\alpha$  et  $\beta$  sont les paramètres de régularisation. Nous utilisons dans notre travail ce type d'approche pour l'estimation jointe de l'image et de la PSF variable en profondeur.

Les termes de régularisation les plus utilisées pour l'image sont ceux présentés dans le chapitre précédent pour lisser l'image et éviter l'amplification de bruit (i.e. régularisation de Tikhonov, régularisation par variation totale, etc). Ces régularisations peuvent également être appliquées sur la PSF afin de pénaliser les PSFs trop étroites et capturer le plus possible du flou dans la PSF. Nous discutons ceci dans la section suivante où nous utilisons un terme de régularisation de type Tikhonov pour la PSF variable en profondeur. De nombreux autres termes de régularisation ont été utilisés dans la littérature comme par exemple la régularisation de Mumford-Shah pour l'image [Bar 2006], une combinaison de termes quadratiques-linéaires ( $l_1$  et  $l_2$ ) [Mugnier 2004], une régularisation basée sur le champ aléatoire de Huber Markov [Xu 2009]. La préférence d'une régularisation par rapport à une autre dépend de l'application considérée et le type de régularité que l'on souhaite imposer sur les variables à estimer.

Une autre façon pour régulariser le problème mal-posé est de paramétrer les variables inconnues. Par exemple, dans [Pankajakshan 2009b] une paramétrisation gaussienne de la PSF en microscopie confocale est considéré, permettant ainsi d'inclure plusieurs contraintes simultanément comme la positivité, la normalisation tout en réduisant le nombre de variable à estimer. nous proposons plus tard une approche similaire pour la restauration avec une PSF variable en profondeur.

Une autre méthode pour réduire le degré de liberté du problème consiste à augmenter le nombre de variables connues en utilisant plusieurs images de la même scène [Schulz 1993, Schulz 1997]. Dans ce type d'approche, appliqué essentiellement en astronomie, la PSF est paramétrée par une phase qui reflètent les déformations que subit le

front d'onde lors de l'acquisition d'une image d'un point source. L'estimation de la PSF se réduit alors à l'estimation de cette phase. Ceci est souvent réalisé par une méthode dite *de diversité de phase* qui consiste à utiliser au moins deux images de la même scène, acquises en introduisant des perturbations connues à la première image (par exemple en introduisant une défocalisation supplémentaire connue) [Paxman 1992]. Nous traitons ce type de méthodes plus en détail dans le chapitre suivant où nous nous intéressons au problème d'estimation de la phase.

Dans toutes ces méthodes, la minimisation du critère est effectuée alternativement en  $f$  pour  $h$  fixé, et en  $h$  pour  $f$  fixé. La minimisation par rapport à chacune des variables peut être effectuée par différentes algorithmes d'optimisation comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent (Newton, gradient conjugué, etc), tout dépend des propriétés de la fonction à optimiser. La convergence de ce schéma de minimisations alternées n'est pas toujours assurée. Dans [Chan 2000], la convergence d'un tel algorithme vers un optimum local est prouvée pour certaine fonctionnelle d'énergie dans laquelle le bruit est supposé gaussien, l'image et la PSF sont mises à jour par un algorithme de déconvolution linéaire.

### 3.2.1.2.b Méthodes stochastiques

Dans un cadre stochastique, toutes les variables du problème sont vues comme étant des réalisations de processus aléatoires. Les estimateurs les plus utilisés dans ce cadre stochastique d'estimation jointe de  $f$  et  $h$  sont l'estimateur du *maximum a posteriori joint* (MAPJ) et l'estimateur de *maximum de vraisemblance joint*. L'estimateur du maximum a posteriori joint (MAPJ) est en particulier le plus utilisé car il permet d'incorporer des contraintes sur les variables à estimer et de restreindre ainsi le nombre de solutions possibles via les distributions de probabilité a priori  $Pr(f)$  et  $Pr(h)$ . Il est donné par l'équation suivante :

$$\begin{aligned} (\hat{f}, \hat{h}) &= \arg \max_{f, h} Pr(f, h | g) \\ &= \arg \max_{f, h} Pr(g | f, h) Pr(f) Pr(h) \end{aligned} \quad (3.3)$$

En prenant l'anti-logarithme de l'équation ci-dessus, on trouve une formulation similaire à celle de l'équation (3.2). La vraisemblance  $Pr(g | f, h)$  est donnée par la statistique de bruit et les distributions de probabilité  $Pr(f)$  et  $Pr(h)$  sont souvent construites à partir d'une distribution Gibbsienne dont la définition dépend des contraintes que l'on souhaite imposer sur les variables inconnues. Différents modèles des lois a priori sont proposés dans [Campisi 2007]. En particulier, le choix des a priori uniformes nous donne l'estimateur du maximum de vraisemblance joint suivant :

$$(\hat{f}, \hat{h}) = \arg \max_{f, h} Pr(g | f, h) \quad (3.4)$$

Une autre approche stochastique est l'*estimateur de la moyenne* qui consiste à échantillonner d'une manière itérative  $f$  et  $h$  suivant les lois  $Pr(f | h, g)$  et  $Pr(h | f, g)$  en utilisant par exemple les échantillonneurs de Metropolis ou de Gibbs [Metropolis 1953,

Green 1995], ensuite prendre la moyenne des valeurs échantillonnées :

$$\begin{aligned}\hat{f} &= \int f Pr(f|h, g) df \\ \hat{h} &= \int h Pr(h|f, g) dh\end{aligned}\tag{3.5}$$

Un des avantages des méthodes stochastiques est qu'elles permettent l'estimation des hyperparamètres au fur et à mesure que l'estimation jointe de  $f$  et  $h$  en considérant que les hyperparamètres sont aussi des variables aléatoires qui suivent des distributions de probabilité déterminées [Orioux 2009, Orioux 2010]. Cependant, les inconvénients de ces approches sont la lenteur de convergence, et la difficulté d'échantillonner les lois probabilité lorsque le support de la PSF est grand et/ou les données sont volumineuses. L'extension de ces méthodes à une PSF SV augmente encore la complexité de calcul à cause de l'augmentation du nombre de variables et le coût de calcul de l'opération de dégradation.

Enfin, nous citons les approches stochastiques par marginalisation telles que l'estimateur du maximum de vraisemblance ou l'estimateur du maximum a posteriori, décrites au paragraphe 3.2.1.1.b. Celles-ci permettent d'estimer la PSF en une première étape, pour ensuite déconvoluer l'image en une seconde étape.

### 3.2.2 Restauration aveugle : flou SV

La plupart des méthodes de restauration aveugle dans le cadre de flou SV sont des extensions des méthodes de déconvolution aveugle précédentes, soit en considérant un flou constant par région, soit en utilisant des modèles d'approximation plus réguliers comme nous l'avons présenté dans le chapitre précédent. Nous pouvons alors diviser les méthodes de restauration aveugle comme dans le cas invariable en deux classes :

- méthodes d'identification a priori du flou SV,
- méthodes d'estimation jointe du flou SV et de l'image

#### 3.2.2.1 Méthodes d'identification a priori du flou SV

Dans cette classe de méthodes, l'image est découpée arbitrairement en zones où la PSF est considérée SI. L'estimation est ensuite effectuée en deux étapes : dans la première étape, une carte de PSFs est obtenue en appliquant localement l'une des méthodes d'identification du flou (voir paragraphe 3.2.1.1). Dans la seconde étape, l'image est estimée soit par l'application d'un algorithme de déconvolution non-aveugle sur les différentes régions de l'image, soit par l'application d'un algorithme de restauration sur la totalité de l'image, prenant en compte les transitions entre les zones voisins. Les méthodes de cette classe ne diffèrent que par les algorithmes utilisés pour l'estimation de la PSF et de l'image.

Par exemple, dans [Guo 1996], la méthode EM est appliquée en chaque zone pour l'estimation de la PSF. L'image est ensuite estimée par la méthode "Constrained Least Squares" en chaque zone séparément. Cette méthode conduit à des artéfacts de décomposition à cause du traitement disjoint des zones.

Dans [Bardsley 2006a], une approche similaire est appliquée à des images astrophysiques 2D. La PSF SI est estimée dans chaque zone par une méthode de diversité de phase.

L'image nette est ensuite estimée par l'algorithme de restauration de Nagy et O'Leary [Nagy 1998]. Cette méthode prend en compte les transitions entre les zones mais le modèle d'interpolation de PSFs n'est pas adapté à nos images de microscopie de fluorescence (i.e. ce modèle de flou SV conduit à une grande erreur d'approximation, cf. section 2.4.4).

Dans [Harmeling 2010], la PSF est estimée dans chaque zone par l'optimisation d'un critère dans lequel l'image nette est initialisée par l'application d'un filtre "shock" à l'image floue, ce qui permet d'accentuer les contours et de capturer tout le flou dans la PSF [Cho 2009]. L'image nette est ensuite estimée en utilisant l'algorithme de déconvolution présenté dans [Krishnan 2009].

Dans toutes ces méthodes, l'estimation de la PSF est réalisée en supposant que celle-ci est invariable par région, les transitions entre les régions ne sont pas prises en compte. Nous proposons plus tard, une méthode où la PSF SV est estimée en prenant en compte ces transitions grâce à la modélisation de la PSF SV par combinaison convexe d'un ensemble de PSFs SI.

Par ailleurs, dans ces méthodes, le nombre de PSFs ainsi que la décomposition d'image considérée sont fixés par l'utilisateur. Dans [Bar 2007], les auteurs proposent une méthode basée sur les contours actifs pour déterminer les limites des régions où le flou peut être considéré homogène. Cependant, dans cette méthode, la variation de flou entre les régions est supposée suffisamment grande pour que les régions puissent être délimitées. Cette méthode est inapplicable à notre problème car elle est complètement basée sur des variations importantes et abruptes du niveau de flou, Ce qui n'est pas le cas en microscopie.

### 3.2.2.2 Méthodes d'estimation jointe du flou SV et de l'image

Dans ces méthodes, le flou SV et l'image sont estimés simultanément en minimisant un critère donné.

Par exemple, dans [Blume 2007], les auteurs estiment l'intensité de la PSF SV  $\tilde{h}(j, j')$  en tout point  $j$  du support de la PSF et pour tout point  $j'$  de l'espace objet, aucune approximation et aucune paramétrisation de la PSF SV n'est considérée. Cette méthode est très coûteuse en temps de calcul.

Dans [Hirsch 2010], la PSF SV est approchée par une combinaison convexe d'un ensemble de PSFs SI, comme dans l'équation (2.34) afin de réduire la complexité de calcul et le nombre de variable à estimer. La PSF SV et l'image sont simultanément estimées en minimisant un critère quadratique provenant de la statistique de bruit gaussienne, aucune fonction de régularisation n'est utilisée. Nous développons une méthode similaire, adaptée au bruit de Poisson présent dans les images de microscopie confocale. Nous réduisons le degré de liberté du problème par l'utilisation de termes de régularisation sur l'image et sur la PSF, et par l'introduction de contraintes sur celle-ci comme la positivité des variables, la normalisation de la PSF, etc.

Dans toutes ces méthodes le bruit considéré est gaussien. Nous proposons dans les deux sections qui suivent deux méthodes de restauration qui prennent en compte le bruit poissonien présent dans les images de microscopie confocale. Dans la première,

nous ne considérons aucune paramétrisation de la PSF. Nous cherchons alors à estimer les intensités des PSFs  $h^1, \dots, h^N$  tout en laissant évoluer leur forme librement. Dans la deuxième méthode, nous considérons un modèle paramétré des PSFs permettant de réduire considérablement le nombre de variables à estimer et contraignant la forme de celles-ci. Nous comparons ces deux approches d'estimation en termes de qualité de restauration et de temps de calcul.

### 3.3 Première méthode proposée : PSF non-paramétrée

Nous proposons une nouvelle méthode de restauration aveugle faisant partie de la classe des méthodes MAPJ. Une des originalités de cette méthode est qu'elle prend en compte à la fois la variabilité du flou en profondeur et le bruit poissonien. En effet, les méthodes antérieures développées dans un cadre de flou SV considèrent un bruit additif gaussien. Nous définissons alors un critère approprié pour l'estimation jointe des PSFs  $h^1, \dots, h^M$  et l'image  $f$ , les fonctions de pondération  $\psi^1, \dots, \psi^M$  étant fixées par l'utilisateur. Nous ne considérons aucune paramétrisation de la PSF i.e. les intensités de chaque PSF sont estimées en chaque voxel de son volume 3D. Ceci conduit à un grand nombre de variables à estimer, mais présente l'avantage de laisser une grande liberté sur la forme de la PSF qui peut être plus ou moins déformée suivant le niveau d'aberration. Étant donné que la solution n'est pas unique, il est important d'injecter le plus possible d'information a priori sur les variables inconnues afin de réduire l'espace des solutions possibles. Nous proposons de combiner les normes  $l_1$  et  $l_2$  afin de définir des termes de régularisation pour l'image et les PSFs. En outre, nous incorporons des contraintes de positivité, de normalisation et de conservation de flux. Après avoir défini le critère à optimiser, nous montrons l'existence d'une solution à ce problème dans des espaces de fonctions que nous définissons dans le paragraphe suivant. Cette preuve d'existence est l'une des originalités de ce travail. En effet, dans tous les travaux précédents, l'existence d'un optimum est soit admise, soit imposée en considérant de fortes hypothèses sur la fonctionnelle à optimiser. Par exemple, dans [Bolte 2010], la fonctionnelle à minimiser, proposée pour une statistique de bruit gaussienne, est supposée coercive, l'existence est alors un résultat direct de cette hypothèse.

Nous optimisons ensuite le critère défini par une méthode de minimisations alternées où à chaque étape de minimisation une seule variable du problème est optimisée en fixant les autres. Nous résolvons chacun des problèmes d'optimisation par la méthode SGP présentée dans le chapitre précédent. Nous désignons cette méthode d'optimisation globale par SG-PAM pour "Scaled Gradient Projection embedded in Alternate Minimization scheme" en anglais. Des tests et des comparaisons sont obtenus sur des images simulées et réelles de microscopie confocale.

Nous divisons cette section en cinq sous-sections. Dans la première sous-section, nous introduisons des notations préliminaires utilisées dans ce travail. Dans la deuxième sous-section, nous définissons le critère MAPJ à optimiser. La troisième sous-section est dédiée à la preuve théorique de l'existence d'une solution de ce problème d'optimisation. Dans la quatrième sous-section, nous décrivons l'algorithme SG-PAM proposé pour la résolution



numérique du problème d'optimisation. Dans la dernière sous-section, nous présentons et discutons certains résultats numériques.

### 3.3.1 Notations

Sans perte de généralité, on considère  $\mathcal{I} = [-1, 1]^3$ , le support de l'image observée, et  $B(O, R)$  une boule fermée de centre  $O$ , et de rayon  $R \in [0, 1]$  tel que  $B(O, R) \subsetneq \mathcal{I}$ . Considérons les espaces suivants :

- $H^1(\mathcal{I}) = \left\{ h \in L^2(\mathcal{I}), \nabla h \in L^2(\mathcal{I})^3 \right\}$
- $\mathcal{H} = \left\{ h \in H^1(\mathcal{I}); h \geq 0; \int_{\mathcal{I}} h(u) du = 1; \text{supp}(h) \subset B(O, R) \right\}$  où  $\text{supp}(h)$  désigne le support de la fonction  $h$ .
- $\mathcal{F} = \left\{ f \in BV(\mathbb{R}^3); f \geq 0; \mathcal{I}\text{-périodique} \right\}$  où  $BV(\mathbb{R}^3)$  est l'espace des fonctions à variations bornées [Aubert 2006].
- $\mathcal{F}_c = \left\{ f \in \mathcal{F}; \int_{\mathcal{I}} f(u) du = c \right\}$ , où  $0 < c < +\infty$  est une constante positive afin de prendre en compte la conservation de flux.

### 3.3.2 Critère MAPJ

En fixant les fonctions de pondération, nous estimons à la fois l'ensemble des PSFs  $h^i, 1 \leq i \leq M$  et l'image nette  $f$  à partir de l'observation  $g$  telles que (cf. paragraphe 1.3.3) :

$$Pr(g/f, h^1, \dots, h^M) = \prod_{j \in \mathcal{I}^d} \frac{\left( \int_{V_j} \tilde{H}(f)(u) du + b_g \right)^{g(j)}}{g(j)!} e^{-\left( \int_{V_j} \tilde{H}(f)(u) du + b_g \right)} \quad (3.6)$$

Afin de régulariser le problème mal-posé, nous introduisons des termes de régularisation de la PSF et de l'image. Comme nous l'avons fait dans le chapitre précédent, nous utilisons un terme de variation totale pour l'image afin de lisser les zones homogènes tout en préservant les contours [Rudin 1992]. En ce qui concerne la régularisation de la PSF, nous utilisons le terme suivant  $\|\nabla h\|_2^2$  qui permet d'obtenir une PSF régulière et de pénaliser ainsi les PSFs trop étroites (la valeur de ce terme est d'autant plus élevée que les variations entre les pixels voisins de la PSF  $h$  sont importantes). En effet, si la PSF est plus étroite de ce qu'elle devrait être, une partie du flou reste associée à l'objet estimé. Ainsi, nous proposons d'estimer  $(f, h^1, \dots, h^M)$  en minimisant le critère régularisé suivant :

$$\begin{aligned} J(f, h^1, \dots, h^M) = & \sum_{j \in \mathcal{I}^d} \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du + b_g \right) \\ & - \sum_{j \in \mathcal{I}^d} g(j) \cdot \log \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du + b_g \right) \\ & + \alpha \int_{\mathcal{I}} |Df| + \sum_{1 \leq i \leq M} \beta^i \|\nabla h^i\|_2^2 \end{aligned} \quad (3.7)$$



Les deux premiers termes de fidélité aux données correspondent à l'anti-logarithme de  $Pr(g/f, h^1, \dots, h^M)$  (équation (3.6)). Le troisième terme est le terme de régularisation de l'image. Le dernier terme est le terme de pénalisation des PSFs étroites.  $\alpha$  et  $\beta^i$ ,  $1 = \dots, M$  sont des paramètres de régularisation qui permettent de pondérer la contribution de chacun des termes de régularisation par rapport aux autres composantes de la fonctionnelle, permettant ainsi d'obtenir la solution la plus régularisée que possible tout en respectant les données.

En plus des termes régularisation, nous prenons en compte d'autres contraintes afin de réduire encore le nombre de solutions possibles : d'une part, nous imposons des contraintes de positivité et de normalisation sur les PSFs, d'autre part, nous imposons des contraintes de positivité et de conservation de flux sur l'image. D'après le lemme 1, les contraintes de conservation de flux et de normalisation de la PSF sont redondantes. Cependant, il est important d'incorporer les deux contraintes dans le problème d'optimisation car comme nous le verrons plus tard, si l'une des contraintes est vérifiée, la procédure d'estimation ne garantit pas forcément l'autre. Ainsi, le problème d'optimisation que nous cherchons à résoudre se formule comme suit :

$$(\hat{f}, \hat{h}^1, \dots, \hat{h}^M) = \arg \min_{\mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M} J(f, h^1, \dots, h^M) \quad (3.8)$$

où  $c = \|g\|_1 = \sum_{j \in \mathcal{J}^d} g(j) - b_g |\mathcal{J}^d|$ , ( $|\mathcal{J}^d| = n$  est le nombre de voxels) et les espaces  $\mathcal{F}_c$  et  $\mathcal{H}^M$  sont définis comme dans le paragraphe 3.3.1. La fonctionnelle  $J(\cdot)$  n'est pas convexe par rapport à toutes les variables  $(f, h^1, \dots, h^M)$  conjointement mais nous pouvons facilement montrer qu'elle est convexe par rapport à chacune des variables séparément (strictement convexe si les données  $g$  sont strictement positives). Nous montrons dans le paragraphe suivant l'existence d'une solution au problème ci-dessus. La preuve reste également valable dans le cas d'une PSF SI. En effet, il suffit de prendre  $M = 1$  and  $\psi^1(u) = 1, \forall u \in \mathbb{R}^3$ .

### 3.3.3 Existence d'une solution

Notre objectif est de montrer l'existence de  $(\hat{f}, \hat{h}^1, \dots, \hat{h}^M) \in \mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M$  satisfaisant l'équation (3.8). D'après [Aubert 2006], il suffit de montrer l'existence d'une suite minimisante  $(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M)_{n \in \mathbb{N}}$  de la fonctionnelle  $J(\cdot)$  qui converge vers  $(f_0, h_0^1, \dots, h_0^M) \in \mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M$  telle que :

$$\lim_{n \rightarrow +\infty} J(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M) \geq J(f_0, h_0^1, \dots, h_0^M). \quad (3.9)$$

Pour ce faire, certains lemmes nécessaires doivent être prouvés :

**Lemme 6.**  $\exists a > 0$  et  $b \in \mathbb{R}$  tel que  $\forall t > 0, \forall j \in \mathcal{J}^d$  :

$$t - g(j) \log(t) \geq at + b. \quad (3.10)$$

*Démonstration.* Soit la fonction suivante pour  $t > 0$  et  $j \in \mathcal{J}^d$  :

$$F(t) = (a - 1)t + g(j) \log(t) + b \quad (3.11)$$

La dérivée première de cette fonction s'écrit comme suit :  $F'(t) = a - 1 + \frac{g(j)}{t}$ . On a  $F'(t) \geq 0 \Leftrightarrow \frac{g(j)}{t} \geq 1 - a$ . Par conséquent, si l'on choisit  $a \in ]0, 1[$ , alors  $F'(t) \geq 0 \Leftrightarrow \frac{g(j)}{1-a} \geq t$ . C'est-à-dire,  $F$  est croissante de 0 à  $\frac{g(j)}{1-a}$  avec  $F(0) = -\infty$ , et décroissante de  $\frac{g(j)}{1-a}$  à  $+\infty$  avec  $F(+\infty) = -\infty$ . Par ailleurs, nous avons :

$$F\left(\frac{g(j)}{1-a}\right) = b - g(j) (1 + \log(1-a) - \log(g(j))). \quad (3.12)$$

Par conséquent, pour  $a \in ]0, 1[$ , nous avons :

$$F\left(\frac{g(j)}{1-a}\right) \leq 0 \Leftrightarrow b \leq \inf_{j \in \mathcal{J}^d} g(j) (1 + \log(1-a) - \log(g(j))) \quad (3.13)$$

et dans ce cas  $F'(t) \leq 0, \Leftrightarrow t - g(j) \log(t) \geq at + b, \forall t > 0, \forall j \in \mathcal{J}^d$ . En particulier, pour  $t = \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du + b_g$ , nous avons :

$$\begin{aligned} & \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du + b_g \right) - g(j) \log \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du + b_g \right) \\ & \geq a \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du + b_g \right) + b \end{aligned} \quad (3.14)$$

□

**Corollaire 1.** À partir du lemme précédent, nous pouvons déduire que :

$$\begin{aligned} J((f_n, h_n^1, \dots, h_n^M)) & \geq (ab_g + b) |\mathcal{J}^d| + a \sum_{j \in \mathcal{J}^d} \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h^i * (\psi^i \cdot f)(u) du \right) \\ & + \alpha \int_{\mathcal{J}} |Df| + \sum_{1 \leq i \leq M} \beta^i \|\nabla h^i\|_2^2 \end{aligned} \quad (3.15)$$

Soit maintenant  $(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M) \in \mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M$  une suite minimisante de  $J(f, h^1, \dots, h^M)$  i.e.  $(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M)$  vérifie :

$$\lim_{n \rightarrow +\infty} J(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M) = \inf_{\mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M} J(f, h^1, \dots, h^M) \quad (3.16)$$

Supposons que l'infimum est fini, il existe alors une constante  $K_1 > 0$  telle que  $J(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M) \leq K_1$ . Ainsi, avec l'équation (3.15), nous déduisons le lemme suivant ( $f_n, h_n^i$  étant positives).

**Lemme 7.** Ils existent des constantes  $C_1 > 0$  et  $C_2 > 0$  telles que pour tout  $1 < i < M$  et pour tout  $n \in \mathbb{N}$ , nous avons :

$$\|\nabla h_n^i\|_2^2 \leq C_1, 1 \leq i \leq M \quad (3.17)$$

$$\int_{\mathcal{J}} |Df_n| \leq C_1 \quad (3.18)$$

$$\sum_{j \in \mathcal{J}^d} \int_{V_j} h_n^i * (\psi^i \cdot f_n)(u) du \leq C_2, \quad 1 \leq i \leq M \quad (3.19)$$

**Corollaire 2.** *Pour tout  $i = 1, \dots, M$ , ils existent  $h_0^i \in \mathcal{H}$  et une sous-suite de  $(h_n^i)_{n \in \mathbb{N}}$  (que l'on note aussi par  $(h_n^i)_{n \in \mathbb{N}}$ ) qui converge faiblement vers  $h_0^i$  dans  $H^1(\mathcal{J})$  et converge fortement vers  $h_0^i$  dans  $L^2(\mathcal{J})$ .*

*Démonstration.* On sait que chaque PSF  $h_n^i, i = 1, \dots, M$  est bornée dans  $L^1(\mathcal{J})$  puisque  $h_n^i \geq 0$  et  $\int_{\mathcal{J}} h_n^i(u) du = 1$ . À partir de l'inégalité de Poincaré, nous avons

$\left| h_n^i - \frac{1}{|\mathcal{J}|} \int_{\mathcal{J}} h_n^i(u) du \right|_{L^2(\mathcal{J})} \leq C |\nabla h_n^i|_{L^2(\mathcal{J})}$  avec  $C$  une constante positive. À partir de l'équation (3.17), nous déduisons :

$$\left| h_n^i - \frac{1}{|\mathcal{J}|} \int_{\mathcal{J}} h_n^i(u) du \right|_{L^2(\mathcal{J})} \leq CC_1 \quad (3.20)$$

Par conséquent,  $h_n^i$  est bornée dans  $L^2(\mathcal{J})$ . D'où, à l'extraction de sous-suite près, nous avons l'existence de  $h_0^i \in H^1(\mathcal{J})$  telle que  $h_n^i$  converge faiblement vers  $h_0^i$  dans  $H^1(\mathcal{J})$  et converge fortement vers  $h_0^i$  dans  $L^2(\mathcal{J})$ .

De plus, il est clair que l'on obtient aussi par passage à la limite  $h_0^i \geq 0, \int_{\mathcal{J}} h_0^i(u) du = 1$ , et  $\text{supp}(h_0^i) \subset B(O, R)$ . Par conséquent,  $h_0^i \in \mathcal{H}$ .  $\square$

**Lemme 8.** *Il existe une constante  $C_4$  telle que  $|f_n|_{L^1(\mathcal{J})} \leq C_4$ .*

*Démonstration.* Pour montrer ce lemme, nous devons tout d'abord prouver le lemme préliminaire suivant.

**Lemme 9.** *Soient  $h \in \mathcal{H}$ , et  $v \in L^2(\mathcal{J})$ ,  $\mathcal{J}$ -périodique, alors nous avons :*

$$|h * v|_{L^1(\mathcal{J})} \leq |v|_{L^1(\mathcal{J})} \quad (3.21)$$

*Démonstration.* Soit  $v \in L^2(\mathcal{J})$ ,  $\mathcal{J}$ -périodique, nous avons :

$$\begin{aligned} |h * v|_{L^1(\mathcal{J})} &= \int_{\mathcal{J}} |h * v(u)| du \\ &= \int_{\mathcal{J}} \left| \int_{\mathbb{R}^2} h(u - u') v(u') du' \right| du \\ &\leq \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathbb{R}^2} h(u - u') |v(u')| du' du. \end{aligned}$$

Grâce à la  $\mathcal{J}$ -périodicité de  $|v(u')|$  et le lemme 2, nous obtenons  $|h * v|_{L^1(\mathcal{J})} \leq \int_{\mathcal{J}} |v(u)| du$ .  $\square$

Maintenant, nous montrons que la suite  $(f_n)_n$  est bornée. Pour ce faire, considérons les deux fonctions suivantes :

$$w_n = \frac{1}{|\mathcal{J}|} \int_{\mathcal{J}} f_n(u) du \quad (3.22)$$

$$v_n = f_n - w_n \quad (3.23)$$

Nous pouvons facilement vérifier que  $\int_{\mathcal{J}} v_n(u) du = 0$  et  $Dv_n = Df_n$ . Par conséquent, à partir de l'équation (3.18), nous obtenons  $\int_{\mathcal{J}} |Dv_n(u)| = \int_{\mathcal{J}} |Df_n| \leq C_1$ . De plus, à partir de l'inégalité de Poincaré, il existe une constante  $C > 0$  telle que :

$$\left| v_n - \frac{1}{|\mathcal{J}|} \int_{\mathcal{J}} v_n(u) du \right|_{L^1(\mathcal{J})} \leq C |Dv_n|_{L^1(\mathcal{J})}. \quad (3.24)$$

Comme  $\int_{\mathcal{J}} v_n(u) du = 0$ , nous obtenons :

$$|v_n|_{L^1(\mathcal{J})} \leq C_3 \text{ avec } C_3 = CC_1 \quad (3.25)$$

Par ailleurs, on sait que  $h_n^i * \psi^i w_n = h_n^i * \psi^i f_n - h_n^i * \psi^i v_n$ , nous obtenons alors :

$$|h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} \leq |h_n^i * \psi^i f_n|_{L^1(\mathcal{J})} + |h_n^i * \psi^i v_n|_{L^1(\mathcal{J})}. \quad (3.26)$$

Grâce à la normalisation des PSFs et le lemme 2, nous avons  $|h_n^i * \psi^i f_n|_{L^1(\mathcal{J})} = |\psi^i f_n|_{L^1(\mathcal{J})} \leq |f_n|_{L^1(\mathcal{J})} = c$ . Ainsi,  $|h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} \leq c + |v_n|_{L^1(\mathcal{J})}$ . À partir de l'inégalité (3.25), nous obtenons pour tout  $i = 1, \dots, M$  :

$$|h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} \leq c + C_3 = C_4 \quad (3.27)$$

De plus, grâce à la périodicité de  $\psi^i$ , nous pouvons montrer que :

$$|h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} = \int_{\mathcal{J}} f_n(u) du. \quad (3.28)$$

En effet,

$$|h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} = \int_{\mathcal{J}} \left| \int_{\mathbb{R}^2} h_n(u - u') \psi^i w_n(u') du' \right| du. \quad (3.29)$$

Étant donné que  $h_n^i$ ,  $\psi^i$  et  $w_n$  sont positives, nous obtenons :

$$\begin{aligned} |h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} &= \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathbb{R}^2} h_n(u - u') \psi^i(u') w_n(u') du' du \\ &= \frac{1}{|\mathcal{J}|} \int_{\mathcal{J}} f_n(u') du' \int_{\mathcal{J}} \int_{\mathbb{R}^2} h_n(u - u') \psi^i(u') du' du \end{aligned} \quad (3.30)$$

Puisque  $\int_{\mathbb{R}^2} h_n^i(u - u') du' = 1, \forall u \in \mathcal{J}$ , et  $\psi^i$  est  $\mathcal{J}$ -périodique, nous obtenons en utilisant le lemme 2 le résultat suivant :

$$|h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} = \frac{1}{|\mathcal{J}|} \int_{\mathcal{J}} f_n(u) du \int_{\mathcal{J}} \psi^i(u) du. \quad (3.31)$$

En sommant sur  $i$  et en tenant en compte que  $\sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u) = 1, \forall u \in \mathcal{J}$ , nous obtenons :

$$\begin{aligned} \sum_{1 \leq i \leq M} |h_n^i * \psi^i w_n|_{L^1(\mathcal{J})} &= \frac{1}{|\mathcal{J}|} \int_{\mathcal{J}} f_n(u) du \int_{\mathcal{J}} \sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(u) du \\ &= \int_{\mathcal{J}} f_n(u) du. \end{aligned} \quad (3.32)$$

Par conséquent,  $\int_{\mathcal{J}} f_n(u) du \leq C_4$  i.e.  $|f_n|_{L^1(\mathcal{J})} \leq C_4$ .

Nous avons montré que  $f_n$  est bornée dans  $BV(\mathcal{J})$  i.e.  $|f_n|_{L^1} \leq C_4$  et  $|Df_n|_{L^1} \leq C_1$ . Il existe alors  $f_0$  telle que  $f_n$  converge faiblement vers  $f_0$  dans  $BV(\mathcal{J})$  et converge fortement vers  $f_0$  dans  $L^1(\mathcal{J})$ .

Maintenant, il reste à prouver que  $f_0 \in \mathcal{F}_c$ . En prenant la limite de  $f_n$ , il est facile de montrer que  $\int_{\mathcal{J}} f_0(u) du = c$ . Il suffit de montrer que  $f_0$  est  $\mathcal{J}$ -périodique. Par souci de clarté, nous présentons la preuve dans le cas unidimensionnel i.e.  $\mathcal{J} = [-1, 1]$ , la période considérée est alors 2.

Soit  $\tilde{f}_0$  la version  $\mathcal{J}$ -périodique de  $f_0$  et  $\phi \in L^1(\mathcal{J})$ . Nous montrons que pour chaque cellule  $\mathcal{J}_k = [-1 + 2k, 1 + 2k], k \in \mathbb{Z}$ ,  $f_n$  converge faiblement vers  $\tilde{f}_0$  dans  $L^1(\mathcal{J})$ .

$$\begin{aligned} \lim_{n \rightarrow +\infty} \int_{-1+2k}^{1+2k} f_n(u) \phi(u) du &= \lim_{n \rightarrow +\infty} \int_{-1}^1 f_n(u + 2k) \phi(u + 2k) du \\ &= \lim_{n \rightarrow +\infty} \int_{-1}^1 f_n(u) \phi(u + 2k) du \\ &= \int_{-1}^1 f_0(u) \phi(u + 2k) du \\ &= \int_{-1+2k}^{1+2k} \tilde{f}_0(u + 2k) \phi(u) du \\ &= \int_{-1+2k}^{1+2k} \tilde{f}_0(u) \phi(u) du \end{aligned}$$

Ainsi,  $f_n$  converge faiblement vers  $\tilde{f}_0$  dans  $L^1(\mathcal{J})$ . D'une façon analogue, nous montrons la périodicité de  $Df_0$ .  $\square$

**Théorème 2.** Le problème  $\inf_{\mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M} J(f, h^1, \dots, h^M)$  a au moins une solution.

*Démonstration.* D'après le lemme précédent, toute suite minimisante  $(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M)_n$  converge (à une sous-suite près) vers  $(f_0, h_0^1, \dots, h_0^M) \in \mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M$ . Nous devons montrer que  $\liminf_{n \rightarrow +\infty} J(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M) \geq J(f_0, h_0^1, \dots, h_0^M)$ .

À partir de la convexité des fonctions  $\int_{\mathcal{J}} |\nabla h^i(u)|^2 du$ ,  $1 \leq i \leq M$  et  $\int_{\mathcal{J}} |Df(u)|$ , nous déduisons que :

$$\liminf_{n \rightarrow +\infty} \int_{\mathcal{J}} |\nabla h_n(u)|^2 du \geq \int_{\mathcal{J}} |\nabla h_0(u)|^2 du \quad (3.33)$$

$$\liminf_{n \rightarrow +\infty} \int_{\mathcal{J}} |Df_n| \geq \int_{\mathcal{J}} |Df_0| du \quad (3.34)$$

Il reste à montrer que :

$$\begin{aligned} \liminf_{n \rightarrow +\infty} \sum_{j \in \mathcal{J}^d} G \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h_n^i * (\psi^i \cdot f_n)(u) du + b_g \right) \\ \geq \sum_{j \in \mathcal{J}^d} G \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h_0^i * (\psi^i \cdot f_0)(u) du + b_g \right) \end{aligned} \quad (3.35)$$

avec  $G(t) = t - g(j) \log(t)$ ,  $\forall t > 0$  et  $j \in \mathcal{J}^d$ .

On a la convergence forte de  $h_n^i * (\psi^i \cdot f_n)$  vers  $h_0^i * (\psi^i \cdot f_0)$  dans  $L^1(\mathcal{J})$ . D'où l'on déduit :

$$\lim_{n \rightarrow +\infty} \int_{V_j} h_n^i * (\psi^i \cdot f_n)(u) du + b_g = \int_{V_j} h_0^i * (\psi^i \cdot f_0)(u) du + b_g \quad (3.36)$$

La continuité de  $G$  permet de conclure que :

$$\begin{aligned} \lim_{n \rightarrow +\infty} \sum_{j \in \mathcal{J}^d} G \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h_n^i * (\psi^i \cdot f_n)(u) du + b_g \right) \\ = \sum_{j \in \mathcal{J}^d} G \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \int_{V_j} h_0^i * (\psi^i \cdot f_0)(u) du + b_g \right) \end{aligned} \quad (3.37)$$

Ainsi, nous avons montré que :  $\liminf_{n \rightarrow +\infty} J(f_n, h_n^1, \dots, h_n^M) \geq J(f_0, h_0^1, \dots, h_0^M)$  et par suite nous avons :  $(f_0, h_0^1, \dots, h_0^M) = \arg \min_{\mathcal{F}_c \times \mathcal{H}^M} J(f, h^1, \dots, h^M)$ .  $\square$

**Remarque 8.** La solution du problème (3.8) n'est pas unique. En effet, nous pouvons montrer que le critère (3.7) est non-convexe par rapport à l'ensemble des variables  $(f, h^1, \dots, h^M)$  conjointement. Néanmoins, il est convexe par rapport à chacune des variables séparément. L'optimisation par un algorithme de descente de gradient aboutit un minimum local qui dépend de l'initialisation. L'utilisation d'algorithme d'optimisation

global de recuit simulé est rédhibitoire en terme de terme de calcul. Nous utilisons un algorithme de minimisations alternées dans lequel l'optimisation par rapport chacune des variables est réalisée par l'algorithme SGP. Nous utilisons le modèle de PSF théorique pour l'initialisation, avec des paramètres fixés par connaissance a priori (l'IR de milieu d'immersion, l'IR du spécimen, et les profondeurs des PSFs).

### 3.3.4 Résolution numérique

Nous nous nous intéressons maintenant à l'approximation numérique d'une solution du problème (3.8). Nous utilisons ici aussi un schéma de minimisation alternée. Le problème de minimisation globale est alors divisé en de nombreux problèmes de minimisation élémentaires où une seule variable est optimisée en fixant les autres à leurs estimées précédentes. Pour résoudre ces problèmes élémentaires, nous utilisons la méthode SGP. Nous désignons cet algorithme par SGPAM pour "SGP embedded in alternate minimization scheme" en anglais.

Dans ce ce qui suit, nous présentons tout d'abord la version discrète du problème considéré. Nous décrivons ensuite le schéma de minimisation alternée que nous adaptons. La mise à jour de l'image étant réalisée comme nous l'avons présentée dans la sous-section 2.5.1.2, nous montrons comment nous avons appliqué l'algorithme SGP pour l'estimation des PSFs.

#### 3.3.4.1 Problème discret

Nous considérons ici les notations discrètes introduites dans le premier chapitre de ce manuscrit. L'image et les PSFs sont respectivement représentées par des vecteurs  $\mathbf{f}, \mathbf{h}^i \in \mathbb{R}^n$ . La convolution circulaire est modélisée par les multiplications matrice-vecteur suivantes :  $\mathbf{H}\mathbf{f} = \mathbf{F}\mathbf{h}$  où  $\mathbf{H}$  et  $\mathbf{F}$  sont des matrices de dimension  $n \times n$  circulantes par blocs circulants par blocs circulants construites respectivement à partir du vecteur image  $\mathbf{f} \in \mathbb{R}^n$  et du vecteur PSF  $\mathbf{h} \in \mathbb{R}^n$ . La fonction discrète que nous cherchons à minimiser est exprimée comme suit :

$$J(\mathbf{f}, \mathbf{h}^1, \dots, \mathbf{h}^M) = \mathbf{1}^T \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \mathbf{H}^i \psi^i \mathbf{f} + \mathbf{b}_g \right) - \mathbf{g}^T \log \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \mathbf{H}^i \psi^i \mathbf{f} + \mathbf{b}_g \right) + \alpha \|\nabla \mathbf{f}\|_1 + \sum_{1 \leq i \leq M} \beta^i \|\nabla \mathbf{h}^i\|_2^2 \quad (3.38)$$

où  $\mathbf{1} \in \mathbb{R}^n$  est un vecteur dont les composantes sont toutes égales à 1,  $\mathbf{b}_g \in \mathbb{R}^n$  est un vecteur constant strictement positif (toutes ses composantes sont égales) qui modélise le bruit de fond, et  $\psi^i \in \mathbb{R}^{n \times n}$ ,  $1 \leq i \leq M$  sont des matrices diagonales contenant les coefficients de pondération. Le calcul numérique des gradients ainsi que des normes  $l_1$  et  $l_2$  est présenté en annexe A. Le problème d'optimisation contraint auquel nous nous intéressons est le

suivant :

$$\begin{aligned} (\hat{\mathbf{f}}, \hat{\mathbf{h}}^1, \dots, \hat{\mathbf{h}}^M) = \arg \min_{(\mathbf{f}, \mathbf{h}^1, \dots, \mathbf{h}^M)} J(\mathbf{f}, \mathbf{h}^1, \dots, \mathbf{h}^M) \quad (3.39) \\ sc \begin{cases} \mathbf{f} \geq 0 \\ \|\mathbf{f}\|_1 = c \\ \mathbf{h}^i \geq 0, 1 \leq i \leq M \\ \|\mathbf{h}^i\|_1 = 1, 1 \leq i \leq M \\ supp(\mathbf{h}^i) \subset B, 1 \leq i \leq M \end{cases} \end{aligned}$$

où  $c = \|\mathbf{g}\|_1 - \|\mathbf{b}_g\|_1$  est une constante positive et  $B$  est un ensemble d'indices donné correspondant au support des PSFs.

### 3.3.4.2 Schéma de minimisations alternées

Une façon triviale pour minimiser  $J(\cdot)$  est d'empiler les vecteurs image et PSFs dans un même vecteur, ensuite appliquer l'une des méthodes d'optimisation sur ce vecteur. Cependant, ceci est très lent à converger notamment si l'on utilise une méthode de descente de gradient pour l'optimisation car l'image et les PSFs n'ont pas les mêmes ordres de grandeur. La méthode de minimisation alternée est très appropriée à une telle situation. Elle consiste à diviser le problème en deux ou plusieurs étapes (suivant le nombre de variables à optimiser) et alterner entre elles. Dans la première étape, les vecteurs de PSF étant fixées, nous estimons l'image  $\mathbf{f}$  comme nous l'avons présentée dans la sous-section 2.5.1.2. Ensuite, dans les étapes suivantes, chacune des PSFs est mise à jour l'une après l'autre, en fixant l'image et les PSFs restantes à leurs estimées précédentes. C'est-à-dire, à partir d'une estimation initiale des PSFs  $\hat{\mathbf{h}}^{(0)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^{(0)}$ , l'algorithme consiste à itérer les étapes suivantes :

- Étape 1 : Estimation de l'image

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{f}}^{(k+1)} = \arg \min_{\mathbf{f}} J(\mathbf{f}, \hat{\mathbf{h}}^{(k)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^{(k)}) \quad (3.40) \\ sc \begin{cases} \mathbf{f} \geq 0, \\ \sum_{1 \leq i \leq n} \mathbf{f}_i = c \end{cases} \end{aligned}$$

- Étape 2 : Estimation de la PSF  $\mathbf{h}^1$  :

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{h}}^{(k+1)} = \arg \min_{\mathbf{h}^1} J(\hat{\mathbf{f}}^{(k+1)}, \mathbf{h}^1, \hat{\mathbf{h}}^{(k)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^{(k)}) \quad (3.41) \\ sc \begin{cases} \mathbf{h}^1 \geq 0 \\ \sum_{1 \leq i \leq n} \mathbf{h}_i^1 = 1 \\ supp(\mathbf{h}^1) \subset B \end{cases} \\ \vdots \end{aligned}$$



– Étape  $M + 1$  : Estimation de la PSF  $\mathbf{h}^M$  :

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{h}}^M{}^{(k+1)} = \arg \min_{\mathbf{h}^M} J \left( \hat{\mathbf{f}}^{(k+1)}, \hat{\mathbf{h}}^1{}^{(k+1)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^{M-1}{}^{(k+1)}, \mathbf{h}^M \right) \quad (3.42) \\ \text{sc} \begin{cases} \mathbf{h}^M \geq 0 \\ \sum_{1 \leq i \leq n} \mathbf{h}_i^M = 1 \\ \text{supp}(\mathbf{h}^M) \subset B \end{cases} \end{aligned}$$

Comme les PSFs SI ont le même ordre de grandeur, il est possible de les empiler en un seul vecteur et d'effectuer la minimisation sur l'ensemble des PSFs conjointement. Cependant, ceci est coûteux en terme de mémoire car il faut charger  $M$  vecteurs de grande taille au même temps. C'est pourquoi, nous avons choisi de minimiser le critère par rapport à chacune des PSFs séparément. Du fait de la non-convexité globale du critère considéré, l'initialisation des PSFs est une étape cruciale afin d'obtenir une bonne estimation. Le modèle théorique de Stokseth présenté au premier chapitre nous donne une bonne estimation en fixant approximativement les paramètres inconnus. Nous justifions ceci plus tard par des tests numériques. Notons que dans cet algorithme nous avons choisi de commencer par l'estimation de l'image car nous disposons du modèle théorique pour l'initialisation des PSFs mais il est également possible de commencer par l'estimation des PSFs si l'on a une bonne estimation de l'image. Par exemple, dans [Cho 2009], l'image nette est initialisée en appliquant un filtre "shock" à l'image floue, ce qui permet d'accentuer les contours et de capturer tout le flou dans la PSF.

Plusieurs méthodes d'optimisation convexe peuvent être utilisées pour résoudre les sous-problèmes ci-dessus (e.g. [Dey 2006]). Nous utilisons la méthode SGP [Bonettini 2009] présentant de convergence rapide et prenant en compte les contraintes sur les variables à estimer. Grâce à cet algorithme, la suite des énergies  $\left( J \left( \hat{\mathbf{f}}^{(k)}, \hat{\mathbf{h}}^1{}^{(k)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^M{}^{(k)} \right) \right)_{k \in \mathbb{N}}$  est convergente. En effet, à chaque étape de l'algorithme d'optimisation global sous-contrainte, la fonctionnelle  $J(\cdot)$  décroît :

$$\begin{aligned} J \left( \hat{\mathbf{f}}^{(1)}, \hat{\mathbf{h}}^1{}^{(0)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^M{}^{(0)} \right) &\geq J \left( \hat{\mathbf{f}}^{(1)}, \hat{\mathbf{h}}^1{}^{(1)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^M{}^{(0)} \right) \\ &\geq \dots \geq J \left( \hat{\mathbf{f}}^{(1)}, \hat{\mathbf{h}}^1{}^{(1)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^M{}^{(1)} \right) \\ &\geq \dots \geq J \left( \hat{\mathbf{f}}^{(K)}, \hat{\mathbf{h}}^1{}^{(K)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^M{}^{(K)} \right) \quad (3.43) \end{aligned}$$

La décroissance de l'énergie est assurée par le choix optimal du pas de descente utilisé dans l'algorithme SGP (l'étape 5 de l'algorithme 2 permet d'obtenir le plus grand pas de descente possible assurant la décroissance de la fonctionnelle d'énergie tout en assurant les contraintes imposées sur la variable optimisée [Bonettini 2009]). Notons que ceci n'est pas forcément garantie si l'on utilise un algorithme de descente classique, par exemple l'algorithme RLTV [Dey 2006]. Par conséquent, la suite  $\left( J \left( \hat{\mathbf{f}}^{(k)}, \hat{\mathbf{h}}^1{}^{(k)}, \dots, \hat{\mathbf{h}}^M{}^{(k)} \right) \right)_{k \in \mathbb{N}}$  est décroissante et bornée inférieurement donc convergente. La résolution numérique de

la première étape de l'algorithme proposée est telle que nous l'avons présentée dans la sous-section 2.5.1.2. Nous décrivons dans le paragraphe suivant comment nous appliquons l'algorithme SGP pour l'estimation des PSFs.

### 3.3.4.3 Algorithme SGP pour l'estimation de la PSF

Pour résoudre chacun des problèmes (3.41) et (3.42), nous suivons une stratégie similaire à celle présentée dans le paragraphe 2.5.1.2. Considérons par exemple le problème d'optimisation par rapport à la PSF  $\mathbf{h}^j$ ,  $j \in \{1, \dots, M\}$ . En désignant par  $\mathbf{F}^i$ ,  $i \in \{1, \dots, M\}$  la matrice obtenue à partir du vecteur  $\psi^i \mathbf{f}$ , nous cherchons à minimiser la fonctionnelle suivante par rapport à  $\mathbf{h}^j$ ,  $j \in \{1, \dots, M\}$  :

$$\mathbf{J}_j(\mathbf{h}^j) = \mathbf{1}^T \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \mathbf{F}^i \mathbf{h}^i + \mathbf{b}_g \right) - \mathbf{g}^T \log \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \mathbf{F}^i \mathbf{h}^i + \mathbf{b}_g \right) + \beta^j \mathbf{J}_j^R(\mathbf{h}^j) \quad (3.44)$$

avec  $\mathbf{J}_j^R(\mathbf{h}^j) = \|\nabla \mathbf{h}^j\|_2^2$ . Pour appliquer l'algorithme SGP à cette fonctionnelle, nous devons calculer son gradient  $\nabla \mathbf{J}_j(\mathbf{h}^j)$  et la matrice de remise à échelle  $S$ . Notons que dans cette fonctionnelle, l'opérateur appliqué à la variable à estimer, n'est pas forcément normalisé ( $\mathbf{F}^i \mathbf{1} \neq 1$ ). Le gradient de la fonctionnelle considérée s'écrit comme suit :

$$\nabla \mathbf{J}_j(\mathbf{h}^j) = F^{jT} (\mathbf{1} - W^{-1} \mathbf{g}) + \beta^j \nabla \mathbf{J}_j^R(\mathbf{h}^j) \quad (3.45)$$

avec  $W = \text{diag} \left( \sum_{1 \leq i \leq M} F^i \mathbf{h}^i + \mathbf{b}_g \right)$  une matrice diagonale. D'une manière analogue à (2.58), nous décomposons  $\nabla \mathbf{J}_j^R(\mathbf{h}^j)$  en une partie positive et une négative (voir annexe A) :

$$-\nabla \mathbf{J}_j^R(\mathbf{h}^j) = U_j^R(\mathbf{h}^j) - V_j^R(\mathbf{h}^j) \quad (3.46)$$

où  $U_j^R(\mathbf{h}^j), V_j^R(\mathbf{h}^j) \in \mathbb{R}^n$  sont des vecteurs positifs. La matrice de remise à échelle  $S$  permet d'améliorer la rapidité de convergence de l'algorithme SGP. Nous pouvons par exemple la choisir à partir de l'itération suivante de l'algorithme RL régularisé :

$$\mathbf{h}^{j(k+1)} = E^{(k)-1} \mathbf{h}^{j(k)} \left( F^{jT} W^{(k)-1} \mathbf{g} + \beta^j U_j^R(\mathbf{h}^{j(k)}) \right) \quad (3.47)$$

où

$$\begin{cases} E^{(k)} = \text{diag} \left( F^j \mathbf{1} + \beta^j V_j^R(\mathbf{h}^{j(k)}) \right) \\ W^{(k)} = \text{diag} \left( F^j \mathbf{h}^{j(k)} + \sum_{i \in \{1, \dots, M\} - \{j\}} F^i \mathbf{h}^i + \mathbf{b}_g \right) \end{cases} \quad (3.48)$$

sont des matrices diagonales. Nous pouvons montrer que l'équation (3.47) est équivalente à la suivante :

$$\mathbf{h}^{j(k+1)} = \mathbf{h}^{j(k)} - E^{(k)-1} \mathbf{h}^{j(k)} \nabla \mathbf{J}_j(\mathbf{h}^j) \quad (3.49)$$

Par conséquent, une expression de la matrice de remise à échelle est donnée par l'équation suivante :

$$\mathbf{S}'^{(k)} = E^{(k)-1} \mathbf{h}^{j(k)} \quad (3.50)$$

Les composantes de  $\mathbf{S}'^{(k)}$  sont également ajustées comme précédemment par l'équation (2.63).

### 3.3.5 Tests expérimentaux

Nous avons testé notre méthode sur des images simulées de microscopie confocale, puis sur des images réelles obtenues en collaboration avec l'INRA et l'UHA. Dans nos tests, les paramètres de l'algorithme SGP ont été fixés comme dans [Bonettini 2009] : le paramètre  $L = 10^{10}$  est utilisé dans (2.63) pour borner les matrices de remise à échelle, les bornes inférieure et supérieure du pas de descente sont fixés comme suit :  $\delta_{min} = 10^{-5}$ ,  $\delta_{max} = 10^5$ . L'algorithme SGPAM est arrêté lorsque l'énergie globale reste quasiment inchangée entre deux itérations successives (i.e. l'erreur normalisée entre les énergies de deux itérations successives est inférieure à un seuil fixé, soit  $10^{-4}$  dans nos tests) ou lorsque le nombre maximal d'itérations est atteint (soit 500 itérations dans nos tests). Seulement quelques itérations de l'algorithme SGP sont exécutées pour l'optimisation de l'une des variables du problème (soit 5 itération dans nos tests) du fait que les valeurs des autres variables ne sont pas optimales. Tous nos tests sont effectués sur une machine ayant un micro-processeur cadencé à 1,86 GHz.

Afin d'évaluer la qualité de la méthode de restauration proposée, nous utilisons deux types de mesure de qualité : les premières sont des mesures avec référence telles que le NMSE et le SSIM, utilisées pour les images simulées, la deuxième est la mesure Q, mesure sans référence que nous utilisons pour évaluer la qualité de restauration des images réelles puisque l'on ne connaît pas l'image nette. Toutes ces mesures sont présentées en annexe B. Nous utilisons cette mesure pour ajuster aussi les paramètres de régularisation (cf. paragraphe 3.3.5.1).

Afin de mieux évaluer notre méthode SGPAM, nous la comparons en terme de qualité de restauration et temps de calcul avec une autre méthode de restauration aveugle basée aussi sur un schéma de minimisation alternée mais les minimisations élémentaires sont réalisées avec une version régularisée de la méthode de Richardson-Lucy (voir les équations (2.60) et (3.47)). Nous désignons cette dernière méthode par RRLAM pour "Regularized Richardson-Lucy embedded in an Alternate Minimization scheme" en anglais. Nous montrons également l'intérêt du modèle du flou variable en profondeur en montant des comparaisons avec la restauration par une seule PSF SI.

#### 3.3.5.1 Choix des paramètres de régularisation

Les paramètres de régularisation  $\alpha$  et  $\beta_i$  ont des effets antagonistes sur les PSFs et sur l'image : des grandes valeurs de  $\beta_i$  conduisent à des PSFs excessivement larges, ce qui a pour effet d'engendrer des rebonds dans l'image reconstruite. En revanche, une très grande valeur de  $\alpha$  produit ce que l'on appelle l'effet de staircasing (ou marches d'escalier) dans l'image reconstruite (image constante par morceaux), ce qui conduit à des PSFs trop étroites. Le choix des paramètres de régularisation a alors une influence directe sur la qualité de l'image reconstruite. Nous avons présenté dans la sous-section 2.2.3 quelques unes des méthodes pour l'estimation d'un seul paramètre de régularisation dans un cadre de déconvolution non-aveugle. La plupart de ces méthodes sont difficilement applicables à notre problème étant donné que le nombre de paramètres à estimer est grand. Une méthode facilement applicable dans ce cas est celle présentée dans [Zhu 2010]. Celle-ci a été uti-

lisée pour estimer des paramètres d'une méthode de débruitage d'image en maximisant la mesure  $Q$ . En effet, plus la mesure  $Q$  est élevée, meilleure est la qualité de l'image en terme de flou et de bruit. De plus, grâce à une technique de décomposition d'image en des sous-images, cette mesure prend en compte la non-homogénéité des dégradations (flou et bruit) dans l'image (voir annexe B). Nous suivons alors une stratégie similaire pour ajuster les paramètres de notre méthode d'estimation. Nous choisissons les paramètres  $\alpha, \beta_i, i = 1, \dots, M$  qui maximisent la mesure  $Q$  de l'image estimée  $\hat{f}_{\alpha, \beta_1, \dots, \beta_M}$ . De plus, afin de ne pas avoir une image qui est sur-déconvoluée, nous imposons que les intensités de l'image soient inférieures à un seuil  $f < f_{max}$  donnée par le système de codage du détecteur (e.g.  $f_{max} = 255$  pour un codage sur 8 bits). C'est-à-dire, les paramètres  $\alpha, \beta_i, i = 1, \dots, M$  sont choisis de façon à avoir l'image la plus nette possible tout en respectant le système de codage du détecteur :

$$\hat{\alpha}, \hat{\beta}_1, \dots, \hat{\beta}_M = \arg \max_{s.c. f < f_{max}} Q(\hat{f}_{\alpha, \beta_1, \dots, \beta_M}) \quad (3.51)$$

Malheureusement, nous n'avons pas d'algorithme pour cette optimisation. L'utilisateur doit choisir un ensemble de valeurs possibles de ces paramètres. Des restaurations multiples pour les différents jeux de paramètres sont effectuées. Le jeu de paramètres optimale est celui qui donne une valeur maximale de  $Q$ .

### 3.3.5.2 Tests sur des images simulées

Nous présentons des résultats sur deux images simulées avec différents niveaux de flou et de bruit. Dans les deux tests, nous considérons un système à deux couches : le spécimen et la lamelle ayant un IR très proche du milieu d'immersion, d'environ 1.515. Nous pouvons augmenter le flou en augmentant la variation d'IRs entre ces deux couches et/ou en diminuant l'ouverture numérique du système et/ou en augmentant l'ouverture du sténopé (pinhole). Comme le bruit considéré est poissonien, le niveau de bruit dépend des intensités des pixels. Les différents niveaux de bruit sont alors obtenus, soit en changeant le flux total de l'image, soit en modifiant la valeur de bruit de fond. En effet, la variance de bruit  $\sigma_N^2$  est égale à la moyenne du signal  $\mu$  au voxel considéré, à laquelle est ajoutée la constante de bruit de fond  $b_g$ . Le rapport signal sur bruit s'écrit comme suit  $SNR = \frac{\mu}{\sigma_N} = \frac{\mu}{\sqrt{\mu + b_g}}$ . Ainsi, pour une image donnée, plus la constante de bruit de fond  $b_g$  est grande, plus le rapport signal sur bruit est faible. Pour une constante de bruit de fond fixée, (en particulier pour  $b_g = 0$ , nous avons  $SNR = \sqrt{\mu}$ ) plus la moyenne du signal est faible, plus le bruit est relativement important. Dans les tests que nous présentons ici, nous augmentons le flou, en augmentant la variation d'IRs (ceci augmentera aussi la variabilité du flou en profondeur), et nous augmentons le bruit en diminuant le flux total de l'image.

Dans notre premier test, nous considérons une image de  $100 \times 100 \times 100$  voxels, de trois billes sphériques de diamètre  $2,5 \mu m$ . Le flux d'intensité total de cette image est 17537. Une coupe axiale de cette image est présentée dans la figure 3.1 (a). Nous désignons cette image par la lettre "A". Les billes sont supposées immergées dans un milieu d'IR  $n_s = 1,48$ . Le microscope confocal est supposé équipé d'un objectif 100X à immersion ( $n_i = 1.515$ ) ayant une ouverture numérique de 1,4. La lamelle est supposée d'IR très

proche de celui de l'huile d'immersion ( $n_g \simeq 1,515$ ), de sorte que les aberrations induites par le changement d'IRs entre ces deux milieux soient négligées. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement  $560nm$  et  $600nm$ . Le diamètre du sténopé du microscope confocal est supposé très faible de sorte que la fonction associée puisse être modélisée par une fonction de Dirac dans le modèle de génération PSF. Les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement fixés à  $50nm$  et  $145nm$ , respectant les règles de Nyquist. Connaissant tous ces paramètres, nous générons 100 PSFs, chacune à une profondeur différente en utilisant le modèle théorique (cf. cadre 1). L'image floue est obtenue en appliquant ces PSFs à l'image originale comme donnée par l'équation (1.8). Nous avons ensuite ajouté à cette image un bruit de fond  $bg = 10^{-4}$  et un bruit de Poisson. Une coupe axiale de l'image obtenue avec un rapport signal sur bruit maximal (PSNR) de  $16dB$ , est présentée dans la figure 3.1 (b).

Afin de restaurer cette image, nous considérons une combinaison de deux PSFs, prises respectivement en haut et en bas de l'échantillon. Les fonctions de pondération sont constantes le long des axes ( $OX$ ) et ( $OY$ ) et varient linéairement le long de l'axe ( $OZ$ ). Les deux PSFs à estimer sont initialisées en utilisant le modèle théorique de PSF, les paramètres inclus dans ce modèle sont fixés en introduisant des erreurs aléatoires. Les paramètres de régularisation sont fixés comme suit  $\alpha = 10^{-3}$  and  $\beta^i = 0.1, i = 1, 2$ . Les PSFs et l'image estimées par les méthodes SGPAM et RLAM sont respectivement présentées dans les figures 3.1 (c), (d), (g), (h), (k), et (l). Nous présentons également dans la figure 3.10 (a) les lignes d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ), passant par les centres des billes restaurées et dans les figures 3.10 (b) et (c), les lignes d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) des PSFs estimées passant par le milieu de leur volume.

Un deuxième test est effectué sur une autre image simulée de taille  $140 \times 140 \times 70$  voxels où le flou et le bruit sont plus important. Nous avons généré numériquement une image d'une coquille de bille d'épaisseur de  $400nm$ , et de diamètre entre  $5\mu m$  (diamètre intérieur) et  $5,8\mu m$  (diamètre extérieur). Des coupes radiale et axiale de cette image (avant dégradation) sont présentées dans la figure 3.3 (a). Nous désignons cette image par la lettre "B". Les mêmes caractéristiques que le système précédent sont considérées (ouverture numérique, longueurs d'ondes, pas d'échantillonnages, etc). Le flou est augmenté en choisissant une variation d'IRs entre le spécimen et le milieu d'immersion plus importante. L'IR du milieu d'immersion étant fixé à 1.515, celui du spécimen est fixé à 1.45. La constante de bruit de fond est fixée à  $bg = 10^{-4}$ . Comme nous l'avons souligné précédemment, le bruit est augmenté en choisissant un faible flux total de l'image, celui-ci est égal à 13141 aboutissant à rapport signal sur bruit maximal de  $PSNR = 11dB$ . Les coupes radiale et axiale de cette image dégradée sont présentées dans la figure 3.3 (b). Les restaurations avec les méthodes SGPAM et RRLAM en utilisant une combinaisons de trois PSFs prises au début ( $d = 0\mu m$ ), au milieu ( $d = 5\mu m$ ) et à la fin ( $d = 10\mu m$ ) de l'échantillon sont respectivement présentées dans les figures 3.3 (c) et (d). Les fonctions de pondération sont linéaires. Les paramètres de régularisation sont fixés comme suit  $\alpha = 2 \cdot 10^{-3}$  et  $\beta^1 = 4 \cdot 10^4, \beta^2 = 5 \cdot 10^5, \beta^3 = 5 \cdot 10^5$ . Par ailleurs, nous donnons dans la table 3.1 le temps de calcul moyen par itération  $t_m$ , le temps de calcul global  $t_g$  et les mesures de similarité NMSE et SSIM calculées entre chacune des images restaurées et l'image

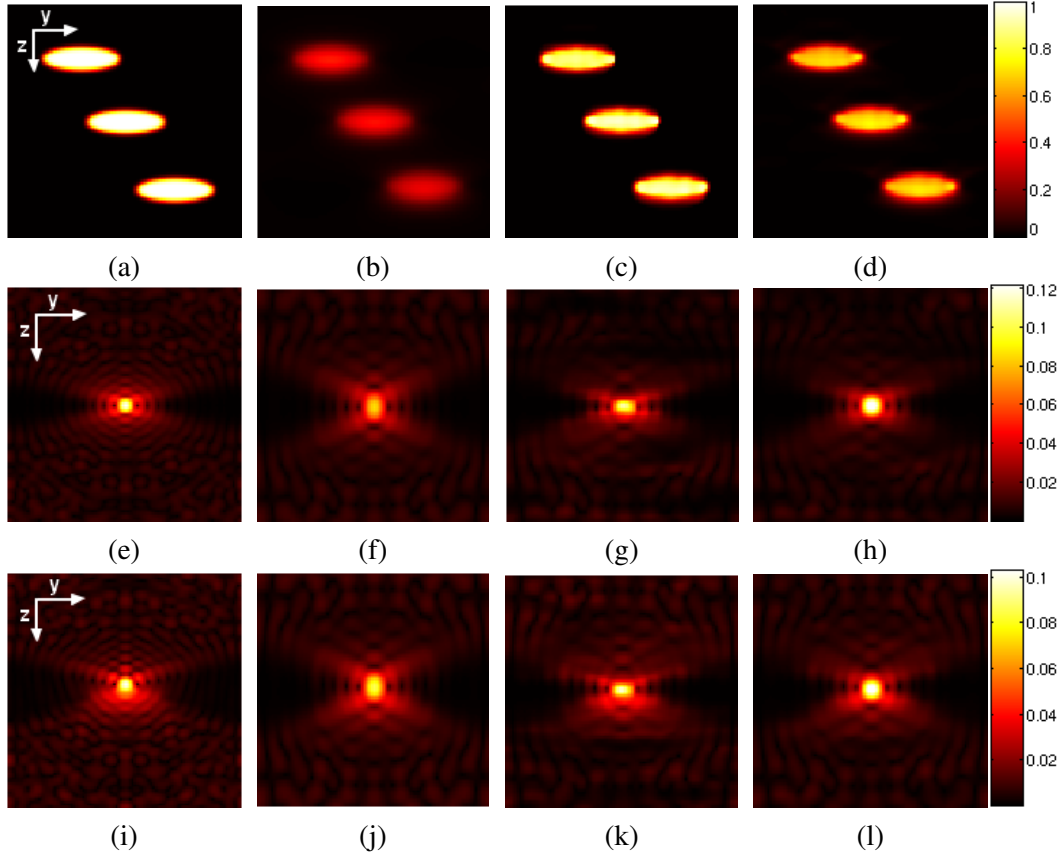


FIGURE 3.1 – Restauration aveugle avec une PSF **non-paramétrée** de l'image A, image simulée d'un système CLSM de trois billes : des coupes axiales (Y, Z) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode SGPAM, (d) restauration avec la méthode RRLAM, (e) vraie PSF  $h^1$ , (f) PSF  $\hat{h}^{1(0)}$  utilisée à l'initialisation, (g) PSF  $\hat{h}^1$  estimée par SGPAM, (h) PSF  $\hat{h}^1$  estimée par RRLAM, (i) vraie PSF  $h^2$ , (j) PSF  $\hat{h}^{2(0)}$  utilisée à l'initialisation, (k) PSF  $\hat{h}^2$  estimée par SGPAM, (l) PSF  $\hat{h}^2$  estimée par RRLAM.

originale. Nous utilisons ces mesures uniquement pour l'image "A" car le décalage des billes est faible (cf. paragraphe 1.4.2). Les aberrations sont plus importantes dans l'image "B", par conséquent le décalage des intensités de l'objet est aussi important. Ces mesures ne sont alors plus applicables car le décalage n'est pas pris en compte dans la méthode d'estimation (nous traitons ce problème dans le chapitre suivant). C'est pourquoi nous utilisons pour cette image la mesure sans référence Q. Nous discutons ces résultats dans le paragraphe 3.3.5.4.

### 3.3.5.3 Tests sur des images réelles

Nous présentons ici des résultats sur deux images réelles de microscopie confocale : la première est une image d'un objet fantôme fluorescent : une bille de diamètre extérieur

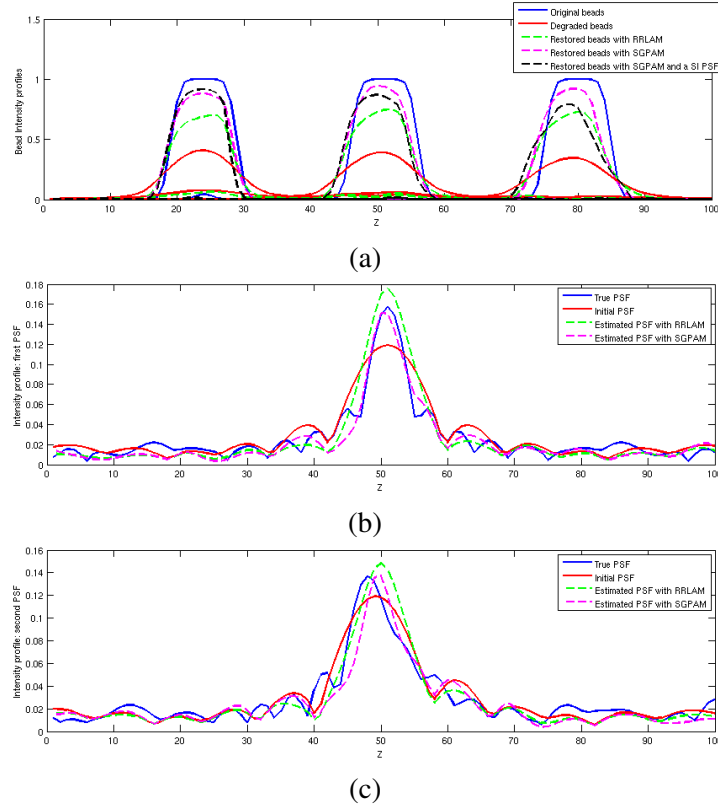


FIGURE 3.2 – (a) Profils d'intensité de l'image A le long de l'axe ( $OZ$ ) passant par les centres des trois billes originales (en bleu), des billes dégradées (en rouge), des billes restaurées avec SGPAM (en rose), des billes restaurées avec RRLAM (en vert), des billes restaurées avec une PSF SI et SGPAM (en noir). (b) et (c) Profils d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) des PSFs prises respectivement en haut et en bas de l'échantillon. Les vraies PSFs sont présentées en bleu, les PSFs utilisées dans l'initialisation sont présentées en rouge, les PSFs estimées avec SGPAM sont présentées en rose, les PSFs estimées avec RRLAM sont présentées en vert.

Image	Image A				Image B			
Méthode	RRLAM		SGPAM		RRLAM		SGPAM	
PSF	SI	SV	SI	SV	SI	SV	SI	SV
NMSE (%)	20.17	16.59	16.03	7.81	-	-	-	-
SSIM	0.85	0.88	0.90	0.95	-	-	-	-
Mesure Q	0.0562	0.0572	0.0771	0.0797	0.0671	0.086	0.0742	0.096
$t_m$ (min)	0.21	0.35	0.22	0.36	0.48	0.79	0.49	1.33
$t_g$ (min)	6.90	9.10	6.7	6.18	7.2	37.19	6	35.8

TABLE 3.1 – Comparaison des méthodes SGPAM et RRLAM avec une PSF **non-paramétrée** sur des images simulées de microscopie confocale.



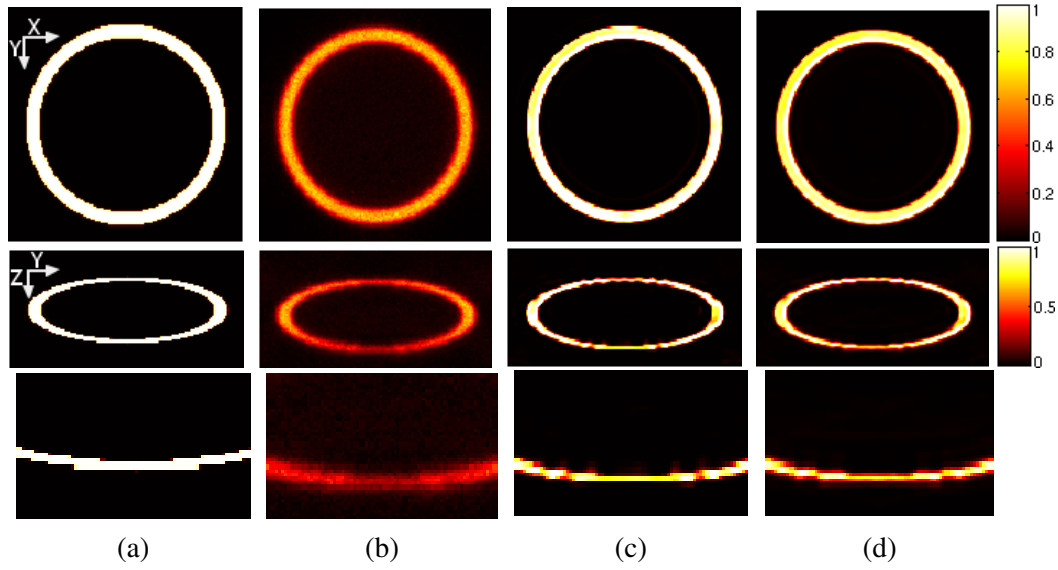


FIGURE 3.3 – Restauration aveugle avec une PSF **non-paramétrée** de l’image  $B$ , image simulée d’un système CLSM d’une coquille de bille : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d’une région (en bas de l’échantillon) de la coupe axiale : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode SGPAM, (d) restauration avec la méthode RRLAM.

d’environ  $6\mu m$  est placée dans le polymère d’IR d’environ 1,45. La surface et le volume intérieur de la bille sont colorés différemment de sorte que la surface de la bille fluoresce dans le rouge ( $620 - 780nm$ ) et le volume de la bille fluoresce dans le vert ( $500 - 578nm$ ). La détection dans le rouge donne alors une image d’une coquille de billes telle que présentée dans la figure 3.4 (a). Nous désignons cette image de taille  $140 \times 140 \times 70$  voxels par la lettre ”C”. Cette image est observée avec un microscope confocal Zeiss LSM 780 équipé d’un objectif 63X à immersion d’huile, d’une ouverture numérique de 1,4. Les pas d’échantillonnage radial et axial sont respectivement de  $54nm$  et  $150nm$ . Le diamètre du sténopé est d’environ  $650nm$ . Nous avons appliqué sur cette image les algorithmes SGPAM et RRLAM en utilisant une combinaison de deux PSFs prises au début ( $d = 0\mu m$ ) et à la fin de l’échantillon ( $d = 14,5\mu m$ ). L’initialisation des PSFs est effectuée par le modèle théorique en fixant approximativement l’IR du polymère, l’IR du milieu d’immersion, et l’IR de la lamelle comme suit :  $n_s = 1,45$ ,  $n_i = 1,5$ ,  $n_g = 1.5$ . Les paramètres de régularisation sont choisis de sorte que la mesure de qualité  $Q$  (voir annexe B) soit maximale :  $\alpha = 0,05$  et  $\beta^i = 0.1$ ,  $i = 1, 2$ . Les images restaurées par SGPAM et RRLAM sont respectivement présentées dans les figures 3.4 (b) et (c). Nous présentons aussi dans la figure 3.4 (d) un résultat de restauration avec une PSF SI et la méthode d’estimation SGPAM.

Un deuxième test est effectué sur une image biologique réelle de cellule de racine de plante présentée dans la figure 3.5 (a). Nous désignons cette image de taille  $200 \times 200 \times 94$  voxels par la lettre ”D”. Cette image est acquise avec un microscope confocal Zeiss LSM



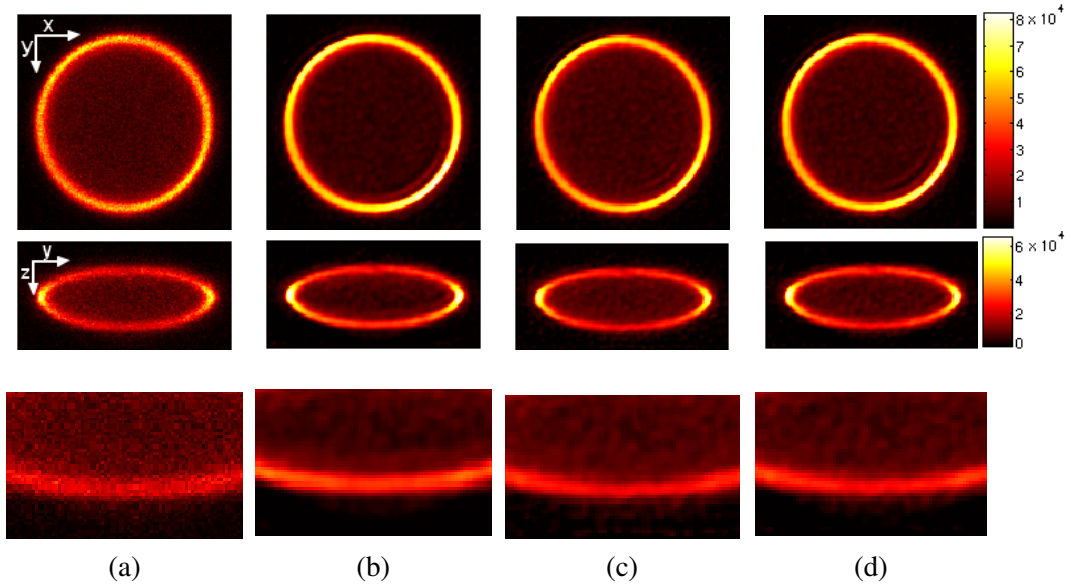


FIGURE 3.4 – Restauration aveugle avec une PSF **non-paramétrée** de l'image C, image réelle d'une coquille de bille observée par un microscope confocal Zeiss LSM 780 ©INRA : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d'une région (en bas de l'échantillon) de la coupe axiale : (a) image observée, (b) restauration avec la méthode SGPAM, (c) restauration avec la méthode RRLAM, et (d) restauration avec la méthode SGPAM et une PSF SI.

510 équipé d'un objectif 40X à immersion ayant une ouverture numérique de 1,3. Les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement  $40nm$  et  $140nm$ . Le diamètre du sténopé est d'environ  $650nm$ . Les résultats de restauration avec SGPAM et RRLAM en utilisant une combinaison de deux PSFs ainsi qu'une PSF SI sont présentés dans les figures 3.5 (b), (c) et (d). Les paramètres de régularisation qui maximisent la mesure  $Q$  sont  $\alpha = 10^{-3}$  et  $\beta^i = 10, i = 1, 2$ .

Image	Image C				Image D			
Méthode	RRLAM		SGPAM		RRLAM		SGPAM	
PSF	SI	SV	SI	SV	SI	SV	SI	SV
Mesure Q	2008	2364	2141	2721	771.71	813.65	814.88	852.63
$t_m$ (min)	0.33	0.52	0.76	1.9	1.61	2.55	4.44	4.48
$t_g$ (min)	5.02	12	5.37	15	47.62	71.40	44.88	31.12

TABLE 3.2 – Comparaison des méthodes SGPAM et RRLAM avec une PSF **non-paramétrée** sur des images réelles de microscopie confocale.

### 3.3.5.4 Discussion des résultats

Il est difficile de tirer des conclusions générales à partir de quelques tests. Néanmoins, sur ces exemples nous pouvons voir l'intérêt du modèle de flou variable en profondeur

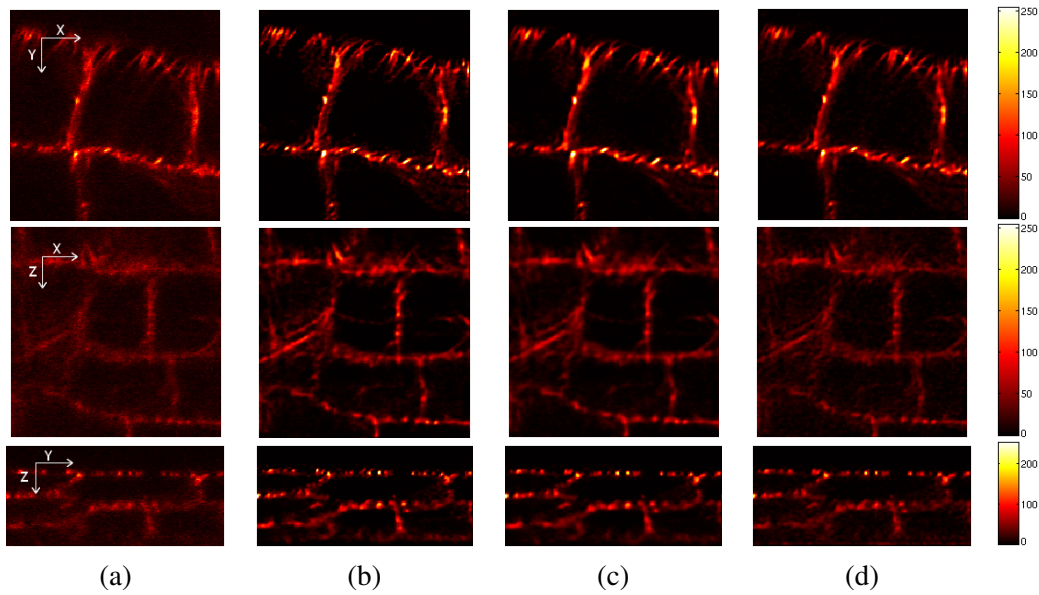


FIGURE 3.5 – Restauration aveugle avec une PSF **non-paramétrée** de l'image  $D$ , image biologique réelle de racines de plante observée par un microscope confocal Zeiss LSM 510 ©INRA. La première ligne montre des coupes radiales ( $X, Y$ ) à une profondeur de  $5\mu m$ , la deuxième ligne montrent des coupes ( $X, Y$ ) à une profondeur de  $10\mu m$  et la troisième ligne montre des coupes axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées. (a) image observée, (b) restauration avec la méthode SGPAM, (c) restauration avec la méthode RRLAM, et (d) restauration avec la méthode SGPAM et une PSF SI.

par rapport à celui du flou SI (cf. tables 3.1 et 3.2). La comparaison des profils d'intensité passant par les centres des billes restaurées par une PSF variable en profondeur (courbe en magenta de la figure 3.10 (a)) et celles restaurées par une PSF SI (courbe en noir de la figure 3.10 (a)) illustre encore cette conclusion. En effet, la dernière bille se trouvant au fond de l'échantillon n'est pas bien restaurée par la PSF SI car le flou est plus important en bas qu'en haut de l'échantillon.

En outre, nous pouvons remarquer à partir des résultats de restauration et des mesures NMSE, SSIM et Q présentées dans les tables 3.1 et 3.2, que la méthode SGPAM offre une meilleure qualité de restauration que celle de la méthode RRLAM. Dans ces deux algorithmes SGPAM et RRLAM, nous considérons le même critère, la même initialisation et les mêmes paramètres de régularisation mais les algorithmes de descente déterministes appliqués à un critère non-convexe empruntent des chemins d'optimisation différents, ce qui aboutit à des solutions différentes (On peut être dans le même bassin d'attraction mais numériquement pas au même endroit).

Par ailleurs, nous pouvons remarquer à partir des temps de calcul présentés dans les tables 3.1 et 3.2 que bien qu'une itération de l'algorithme SGPAM soit plus lente que celle de l'algorithme RRLAM, SGPAM converge un peu rapidement car il nécessite moins d'itérations que RRLAM. Ceci est dû à l'utilisation de la matrice de remise à échelle et du choix adaptatif du pas de descente. Pour mieux illustrer ceci, nous présentons dans la figure

3.6 les courbes d'évolution de la fonctionnelle d'énergie en fonction des itérations pour les deux algorithmes SGPAM et RRLAM obtenue pour l'image A. Il n'y a pas de grande différence dans les temps de calcul sauf pour l'image D (pour l'image C, c'est l'inverse). Ce ne sont pas des conclusions générales car on n'a pas beaucoup de tests. Tout doit être confirmé par des tests sur un plus grand nombre d'images.

Dans le but de régulariser davantage le problème mal-posé, nous décrivons dans la section suivante une méthode de restauration aveugle utilisant une PSF paramétrée.

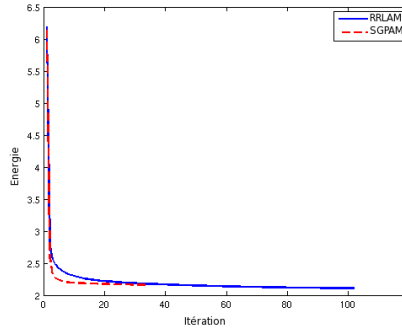


FIGURE 3.6 – Décroissance de la fonctionnelle d'énergie globale en fonction des itérations pour la méthode SGPAM (en rouge) et la méthode RRLAM (en bleu).

### 3.4 Seconde méthode proposée : PSF paramétrée

Bien que le modèle de PSF non-paramétrée aboutisse à des résultats de restauration satisfaisant, il reste coûteux en temps de calcul, notamment pour des spécimens épais présentant une grande variation d'IRs car ceci nécessite un nombre important de PSFs SI. De plus, dans cette méthode le nombre de variables à estimer ( $n^{(M+1)}$ ) dépasse énormément le nombre de variables observées ( $n$ ), ce qui augmente le degré de liberté du problème. Une approche pour réduire le nombre de paramètres à estimer est d'utiliser un modèle de PSF paramétrée. L'étude de l'approximation gaussienne de la PSF que nous avons présentée dans le premier chapitre de ce manuscrit a montré que l'erreur d'approximation ne dépasse pas 1 % pour des faibles ouvertures numériques et 15 % pour des grande ouverture numérique. Avec une telle modélisation, le lobe principal de la PSF, où tout l'énergie de la PSF est concentrée, est bien modélisé, les faibles rebonds à l'entour de celui-ci ne sont pas bien modélisés. Par ailleurs, une telle paramétrisation permet d'assurer naturellement la positivité et la normalisation de la PSF. Nous proposons de modéliser la PSF variable en profondeur par une combinaison convexe d'un ensemble de PSFs SI, chacune d'elles est modélisée par une fonction gaussienne  $h^G_{\theta_i}$ ,  $i = 1, \dots, M$  donnée par trois paramètres  $\theta_i = (\sigma_{ri}, \sigma_{zi}, \varepsilon_i)$  où  $\sigma_{ri}$  et  $\sigma_{zi}$  modélisent respectivement l'étalement du flou radial et axial, et  $\varepsilon_i$  est une variable permettant d'avoir une bonne approximation pour des fonctions gaussiennes normalisées au sens de la norme  $l_1$  (voir paragraphe 1.4.3). Dans ce travail, nous ne prenons pas en compte le paramètre de décalage de la PSF lié aux aberrations (i.e. la moyenne  $\mu_z$  dans l'équation (1.39)). En effet, la seule image observée ne permet pas de

remonter à cette information. De plus, dans la méthode d'estimation présentée dans la section précédente, le décalage n'est également pas estimé à cause du manque d'information mais le modèle de PSF non-paramétrée présente plus de liberté sur la forme et la position du maximum d'intensité de la PSF. Les PSFs estimée par ce modèle ne sont donc pas forcément centrées (voir figure 3.10 (b) et (c)). L'opérateur de flou variable en profondeur  $\tilde{\tilde{H}}_\theta$  que nous utilisons dépend de l'ensemble des paramètres  $\theta = \{\theta_i, i = 1, \dots, M\}$  et s'exprime comme suit, ce qui permet de réduire l'estimation des PSFs SI à l'estimation  $\theta$  :

$$\tilde{\tilde{H}}_\theta(f) = \sum_{1 \leq i \leq M} h_{\theta_i}^G * (\psi^i \cdot f) \quad (3.52)$$

Dans cette section, nous proposons un terme de régularisation simplifié pour la modélisation gaussienne. Ensuite, nous exprimons le critère MAPJ à optimiser ainsi que les contraintes sur les variables à estimer. Nous décrivons ainsi un algorithme permettant d'estimer à la fois l'objet et les paramètres de la PSF. Nous présentons finalement des tests et des comparaisons sur des images simulées et réelles de microscopie confocale.

### 3.4.1 Régularisation de la PSF

Comme dans la section précédente, nous souhaitons obtenir la PSF la plus étalée possible (tout en respectant les données). Nous pouvons alors utiliser le terme de pénalisation que nous avons proposé précédemment :

$$J_1^R(\theta) = \sum_{i=1}^M \beta^i \|\nabla h_{\theta_i}\|_2^2 \quad (3.53)$$

avec  $\beta^i > 0$  les paramètres de régularisation. Un autre moyen dans le cas d'une modélisation par des fonctions gaussiennes est définir le terme de régularisation par :

$$J_2^R(\theta) = \sum_{i=1}^M \beta^i \left( \frac{2}{\sigma_{r_i}^2} + \frac{1}{\sigma_{z_i}^2} \right) \quad (3.54)$$

Ce qui permet d'imposer que les variances des gaussiennes soient les plus grandes possible. Nous pouvons mathématiquement montrer que ces deux termes sont équivalents pour des faibles valeurs de  $(\sigma_{r_i}, \sigma_{z_i})$ . La figure 3.7 illustre ceci pour une seule PSF unidimensionnelle.

**Définition 4.** Soit  $a \in \mathbb{R}$ , et soient  $f$  et  $g$  deux fonctions de la variable réelle  $x$ . On suppose que  $g$  ne s'annule pas sur un voisinage de  $a$ . On dit que  $f$  est équivalent  $g$  en  $a$  ou que  $g$  équivaut à  $f$  en  $a$  et on note  $f(x) \underset{x \rightarrow a}{\sim} g(x)$  si :

$$\lim_{x \rightarrow a} \frac{f(x)}{g(x)} = 1. \quad (3.55)$$

**Théorème 3.** Les termes  $J_1^R(\theta)$  et  $J_2^R(\theta)$  sont équivalents au voisinage de zéro (i.e. composantes nulle du vecteur  $\theta$ ).

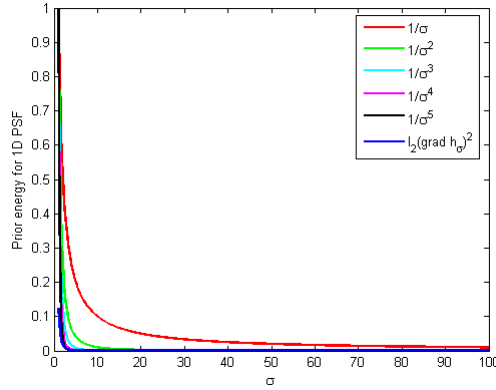


FIGURE 3.7 – Variation de la fonction de régularisation  $J_1^R(\sigma) =$  en bleu et les régularisations  $\frac{1}{\sigma^\lambda}$ , pour différentes valeurs de  $\lambda > 0$  en fonction de  $\sigma$  pour une PSF unidimensionnelle.

*Démonstration.* Montrons tout d'abord ce théorème pour une seule PSF unidimensionnelle. Soit  $h_\sigma$  une PSF gaussienne normalisée sur l'intervalle borné  $[-1, 1]$ , donnée par l'équation suivante :

$$h_\sigma(x) = \frac{1}{c_\sigma} \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right), \text{ avec } x \in [-1, 1] \text{ et } c_\sigma = \int_{-1}^1 \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right) dx. \quad (3.56)$$

La dérivée de  $h_\sigma(x)$  par rapport à  $x$  s'écrit comme suit :

$$h'_\sigma(x) = -\frac{x}{\sigma^2} h_\sigma(x) \quad (3.57)$$

La régularisation  $\|\nabla h_\sigma\|_2^2$  s'exprime alors comme suit :

$$\begin{aligned} \|\nabla h_\sigma\|_2^2 &= \int_{-1}^1 |h'_\sigma(x)|^2 dx \\ &= \int_{-1}^1 h'_\sigma(x) h'_\sigma(x) dx \end{aligned} \quad (3.58)$$

En effectuant une intégration par partie, nous obtenons :

$$\begin{aligned}
\|\nabla h_\sigma\|_2^2 &= -\frac{2}{\sigma^2} h_\sigma^2(1) - \int_{-1}^1 h_\sigma(x) h_\sigma''(x) dx \\
&= -\frac{2}{\sigma^2} h_\sigma^2(1) - \int_{-1}^1 h_\sigma(x) \left( -\frac{1}{\sigma^2} h_\sigma(x) - \frac{x}{\sigma^2} h_\sigma'(x) \right) dx \\
&= -\frac{2}{\sigma^2} h_\sigma^2(1) + \frac{1}{\sigma^2} \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx - \int_{-1}^1 \frac{x^2}{\sigma^4} h_\sigma^2(x) dx \\
&= -\frac{2}{\sigma^2} h_\sigma^2(1) + \frac{1}{\sigma^2} \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx - \|\nabla h_\sigma\|_2^2 \\
&= -\frac{1}{\sigma^2} h_\sigma^2(1) + \frac{1}{2\sigma^2} \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx \\
&= \frac{1}{\sigma^2} \left( \frac{1}{2} \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx - h_\sigma^2(1) \right)
\end{aligned} \tag{3.59}$$

Par ailleurs, on sait que  $h_\sigma(x) < h_\sigma^2(x) < 1$ . Nous avons alors,  $\int_{-1}^1 h_\sigma(x) dx \leq \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx \leq 2$ , ou encore  $1 \leq \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx \leq 2$ . Cela signifie que  $\lim_{\sigma \rightarrow 0} \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx = m$  avec  $1 \leq m \leq 2$ . Ainsi, nous avons :

$$\lim_{\sigma \rightarrow 0} \frac{1}{2} \int_{-1}^1 h_\sigma^2(x) dx - h_\sigma^2(1) = \frac{m}{2} \tag{3.60}$$

Par conséquent,  $\|\nabla h_\sigma\|_2^2$  est équivalent à  $\frac{1}{\sigma^2}$  au voisinage de 0.

Nous montrons maintenant cette propriété pour la fonction gaussienne tridimensionnelle suivante :

$$h_\theta^G(x, y, z) = \frac{\exp\left(-\frac{x^2+y^2}{2\sigma_r^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right)}{c_\theta}, \text{ avec } c_\theta = \int_{\mathcal{S}} \exp\left(-\frac{x^2+y^2}{2\sigma_r^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right) dx dy dz \tag{3.61}$$

où  $\mathcal{S}$  est un ensemble borné de  $\mathbb{R}^3$ , soit par exemple  $\mathcal{S} = [-1, 1]^3$ . Remarquons la séparabilité de cette fonction en trois fonctions unidimensionnelles comme suit :

$$h_\theta^G(x, y, z) = h_{\sigma_r}(x) h_{\sigma_r}(y) h_{\sigma_z}(z) \tag{3.62}$$

où les fonctions  $h_{\sigma_r}$  et  $h_{\sigma_z}$  sont donnée par l'équation (3.56). Par ailleurs, nous avons :

$$\|\nabla h_{\theta}^G\|_2^2 = \int_{\mathcal{J}} \left[ \left( \frac{\partial h_{\theta}^G}{\partial x}(x, y, z) \right)^2 + \left( \frac{\partial h_{\theta}^G}{\partial y}(x, y, z) \right)^2 + \left( \frac{\partial h_{\theta}^G}{\partial z}(x, y, z) \right)^2 \right] dx dy dz \quad (3.63)$$

La première composante de l'équation ci-dessus s'écrit comme suit :

$$\begin{aligned} \int_{\mathcal{J}} \left( \frac{\partial h_{\theta}^G}{\partial x}(x, y, z) \right)^2 dx dy dz &= \int_{\mathcal{J}} (h'_{\sigma_r})^2(x) h_{\sigma_r}^2(y) h_{\sigma_z}^2(z) dx dy dz \\ &= \int_{-1}^1 (h'_{\sigma_r})^2(x) dx \int_{-1}^1 h_{\sigma_r}^2(y) dy \int_{-1}^1 h_{\sigma_z}^2(z) dz \\ &\sim \frac{1}{\sigma_r^2}, \text{ pour } \sigma_r, \sigma_z \simeq 0. \end{aligned} \quad (3.64)$$

□

Nous montrons d'une manière analogue que :

$$\begin{aligned} \int_{\mathcal{J}} \left( \frac{\partial h_{\theta}^G}{\partial y}(x, y, z) \right)^2 dx dy dz &\sim \frac{1}{\sigma_r^2}, \\ \int_{\mathcal{J}} \left( \frac{\partial h_{\theta}^G}{\partial z}(x, y, z) \right)^2 dx dy dz &\sim \frac{1}{\sigma_z^2}, \text{ pour } \sigma_r, \sigma_z \simeq 0 \end{aligned} \quad (3.65)$$

Nous obtenons ainsi l'équivalence entre  $\|\nabla h_{\theta}^G\|_2^2$  et  $\left( \frac{2}{\sigma_r^2} + \frac{1}{\sigma_z^2} \right)$  pour des faibles valeurs de  $\sigma_r$  et  $\sigma_z$ . Nous considérons alors dans ce qui suit le terme  $J_2^R(\theta)$  car il sera plus rapide à calculer.

En plus de ce terme de régularisation, nous incorporons d'autres informations sur la PSF. En effet, comme la solution  $(f, \theta)$  n'est pas unique, il est important d'intégrer autant que possible d'informations sur les variables inconnues pour limiter le nombre de solutions possibles et réduire ainsi le degré de liberté du problème. Deux informations importantes sur la PSF variable en profondeur peuvent être incluses dans notre modèle. Tout d'abord, comme la résolution axiale est moins bonne que la résolution radiale, on peut imposer que la PSF soit plus étalée suivant l'axe  $(OZ)$  que suivant les axes  $(OX)$  et  $(OY)$ . C'est-à-dire, nous imposons que la variance axiale de la PSF  $\sigma_{z_i}$  soit plus grande que la variance radiale  $\sigma_{r_i}$ . De plus, suivant la variation d'IRs entre le milieu d'immersion, la lamelle et l'échantillon, nous pouvons savoir si la PSF est plus ou moins étalée en haut ( $z = 0$ ) qu'en bas ( $z = z_{max}$ ) de l'échantillon. Nous considérons ici un cas où l'étalement du flou augmente avec l'augmentation de la profondeur. Soit alors  $\sigma_r^{i+1} \geq \sigma_r^i$  et  $\sigma_z^{i+1} \geq \sigma_z^i$  où l'indice  $i$  varie entre 1 pour une PSF juste sous la lamelle à  $M$  pour la PSF la plus en profondeur. Cette contrainte correspond en pratique à n'importe quel système optique à deux ou plusieurs couches où l'IR varie dans un seul sens en fonction de la profondeur (augmente ou

diminue). Par exemple, pour un système à trois couches (milieu d'immersion ( $n_i$ ), lamelle ( $n_g$ ) et spécimen homogène ( $n_s$ )), l'étalement de la PSF augmente avec la profondeur si  $n_i \geq n_g \geq n_s$  ou  $n_i \leq n_g \leq n_s$ . Pour un spécimen hétérogène, cette information est aujourd'hui accessible grâce à une technique d'imagerie de tomographie diffractive (cf. annexe C). Ce système nous donne une carte de variation d'IRs dans un spécimen hétérogène. Cependant, la valeur d'IR obtenue par un tel système n'est qu'une valeur relative, donc ne donne qu'une indication sur le sens de variation d'IR dans le spécimen. La contrainte peut être alors changée suivant la distribution d'indices dans le spécimen. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, différentes techniques permettent d'incorporer des connaissances d'étalement des PSF en profondeur a priori sur les variables inconnues (projection, pénalisation, paramétrisation, etc). Nous proposons ici d'inclure cette contrainte en paramétrant les PSFs comme suit :

$$h^1 \begin{cases} \sigma_{r_1} = \omega_1^2 \\ \sigma_{z_1} = \omega_1^2 + \eta_1^2 \end{cases}, \dots, h^i \begin{cases} \sigma_{r_i} = \sum_{k=1}^i \omega_k^2 \\ \sigma_{z_i} = \omega_1^2 + \sum_{k=1}^i \eta_k^2 \end{cases} \quad (3.66)$$

avec  $\omega_i, \eta_i \in \mathbb{R}$ . Par conséquent, les nouveaux paramètres à estimer sont :  $\theta = \{\omega_i, \eta_i, i = 1, \dots, M\}$ . Grâce à ce paramétrage, la positivité des écarts types  $\sigma_{r_i}$  et  $\sigma_{z_i}$  est assurée. Notons que dans cette paramétrisation, la contrainte  $\sigma_{z_i} \geq \sigma_{r_i}$  est assurée que pour la première PSF. Nous introduisons cette contrainte pour les autres PSFs en ajoutant le terme de pénalisation suivant à la fonctionnelle d'énergie à optimiser :

$$J^P(\theta) = \sum_{i=2}^M \varphi(\sigma_{r_i}, \sigma_{z_i}), \text{ avec } \varphi(\sigma_{r_i}, \sigma_{z_i}) = \begin{cases} 0 & \text{Si } \sigma_{r_i} < \sigma_{z_i} \\ +\infty & \text{Sinon} \end{cases} \quad (3.67)$$

Nous verrons dans le paragraphe suivant comment nous estimons ces paramètres conjointement avec l'image.

### 3.4.2 Critère MAPJ et résolution numérique

Nous nous intéressons maintenant à l'estimation des paramètres  $\theta$  et l'image  $f$  par l'optimisation d'un critère similaire à celui considéré dans la section 3.3 :

$$J(f, \theta) = \sum_{j \in \mathcal{J}^d} \left( \sum_{1 \leq i \leq M} \tilde{H}_\theta(f)(j) + b_g \right) - \sum_{j \in \mathcal{J}^d} g(j) \cdot \log \left( \tilde{H}_\theta(f)(j) + b_g \right) + \alpha \|\nabla f\| + J_2^R(\theta) + J^P(\theta) \quad (3.68)$$

Nous utilisons un schéma de minimisation alternée pour l'optimisation de ce critère. Nous itérons les deux étapes de minimisation suivantes ( $k$  étant le compteur d'itérations) :

- Étape 1 : Estimation de l'image :  $\hat{f}^{(k+1)} = \arg \min_{\substack{f \geq 0, \\ \|f\|_1 = c}} J(f, \hat{\theta}^{(k)})$
- Étape 2 : Estimation des paramètres de la PSF :  $\hat{\theta}^{(k+1)} = \arg \min_{\theta \in \mathbb{R}^{2M}} J(\hat{f}^{(k+1)}, \theta)$



Comme le critère est convexe et différentiable par rapport à la variable  $f$ , la première étape de minimisation est réalisée par l'algorithme SGP. Cependant, le critère n'est pas convexe par rapport aux variables  $\theta$ . La forme de la fonction d'énergie  $J(\theta)$  est présentée sur la figure 3.8 où nous traçons le terme d'attache aux données (courbe en rouge), et la fonction d'énergie globale en considérant les termes de régularisation  $J_1^R(\theta)$  (courbe en bleu), et  $J_2^R(\theta)$  (courbe en vert), en fonction de la première composante de  $\theta$ . Cette figure montre cependant que le critère est localement convexe. Nous pouvons alors utiliser un algorithme de descente de gradient pour l'optimisation mais ceci conduira à une solution qui est très liée à l'initialisation. En particulier, si l'initialisation est beaucoup plus grande que le vrai paramètre  $\omega_1$ , nous obtenons une solution inacceptable (voir figure 3.8). De plus, comme les composantes de  $\theta$  n'ont pas le même ordre de grandeur, le calcul avec un tel algorithme d'optimisation risque d'être assez lent. Un algorithme de minimisation globale doit être alors utilisé pour ce problème. Nous choisissons l'algorithme de recuit simulé [van Laarhoven 1987] pour effectuer la deuxième étape de l'algorithme proposé. L'initialisation des paramètres  $\theta$  est effectuée à partir du modèle théorique de PSF en fixant approximativement les paramètres physiques et en cherchant la fonction gaussienne la plus proche de la PSF théorique (comme nous l'avons présenté dans le premier chapitre de ce manuscrit). Nous montrons des tests numériques dans le paragraphe suivant.

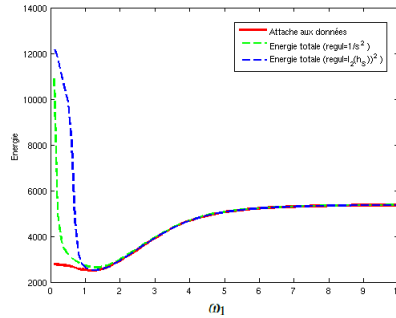


FIGURE 3.8 – L'énergie d'attache aux données en rouge, l'énergie globale avec la régularisation  $J_1^R(\theta)$  en bleu, et l'énergie globale avec la régularisation  $J_2^R(\theta)$  en vert, en fonction de la variable  $\omega_1$ .

### 3.4.3 Tests expérimentaux

Nous testons cette méthode d'estimation sur les mêmes images simulées et réelles considérées dans la section précédente. Afin d'évaluer les résultats d'estimation, nous calculons les mesures de qualité NMSE et SSIM pour l'image A (le décalage des billes dû aux aberrations n'est pas très important), et la mesure sans référence Q pour les autres images. Nous comparons les résultats obtenus à ceux présentés dans la section précédente avec une PSF non-paramétrée. Dans ces tests, les paramètres de la PSF sont initialisés en cherchant les PSFs gaussiennes les plus proches des PSFs utilisées dans l'initialisation de l'algorithme SGPM présenté dans la section précédente. Les paramètres de régularisation sont choisis comme précédemment i.e. ceux qui maximisent la mesure de qualité sans référence

Q. L'algorithme global est arrêté lorsque l'erreur entre les énergies de deux itérations successives est inférieure à seuil fixé ( $10^{-4}$  dans nos tests).

### 3.4.3.1 Tests sur des images simulées

Nous avons fait tourner l'algorithme d'estimation proposé sur les images simulées A et B.

Pour l'image A (cf. figure 3.3 (a)), nous avons considéré comme précédemment une combinaison de deux PSFs gaussiennes dont l'initialisation est présentée dans les figures 3.9 (f) et (j). Les paramètres de régularisation obtenus par maximisation de la mesure Q sont  $\alpha = 0,005$  et  $\beta^1 = 1, \beta^2 = 1000$ . L'image et les PSFs estimées sont présentées dans les figures 3.9 (c), (g), et (k). Nous présentons aussi dans les figures 3.9 (d) et (h) les résultats d'estimation par une seule PSF gaussienne SI qui montrent encore l'intérêt du modèle de PSF variable en profondeur. Ce premier test montre des résultats encourageants que nous confirmons par des valeurs numériques présentées dans la table 3.3.

En ce qui concerne le test sur l'image B (cf. figure 3.11 (a)), nous avons considéré une combinaison de trois gaussiennes. Les paramètres de régularisation qui maximisent la mesure Q sont  $\alpha = 10^{-4}$  et  $\beta^1 = 1, \beta^2 = 10, \beta^3 = 1000$ . Ces paramètres aboutissent au résultat de restauration présenté dans la figure 3.11 (b). Nous comparons ce résultat à celui obtenu par une PSF SI, présenté dans la figure 3.11 (c). Dans la table 3.3, nous donnons les valeurs de mesure de qualité Q et le temps de calcul. Nous discutons ces résultats dans le paragraphe 3.4.4.

### 3.4.3.2 Tests sur des images réelles

Nous testons ici la méthode d'estimation proposée sur les images réelles C et D.

Le résultat de restauration de l'image C (cf. figure 3.12 (a)), avec une combinaison de deux gaussiennes est présenté dans la figure 3.12 (c) et celui obtenu avec une PSF gaussienne SI est présenté dans la figure 3.12 (e). Les paramètres de régularisation estimés par la méthode proposée sont :  $\alpha = 0,05$  et  $\beta^1 = 10, \beta^2 = 10$ . La mesure Q optimale obtenue pour ces valeurs de paramètres est donnée dans la table 3.4.

La restauration de l'image D (cf. figure 3.13 (a)) par une combinaison de deux gaussiennes aboutit au résultat présenté dans la figure 3.13 (b). Ce résultat est obtenu pour les valeurs de paramètres suivantes maximisant la mesure Q :  $\alpha = 0,001$  et  $\beta^1 = 10, \beta^2 = 10$ . Nous comparons ce résultat à celui obtenu par une PSF gaussienne SI montré dans la figure 3.13 (c). Les valeurs de la mesure Q données dans la table 3.4 montrent un léger avantage de la méthode proposée par rapport à déconvolution par une seule PSF SI.

### 3.4.4 Discussions et comparaisons

À partir des résultats présentés dans cette section, nous remarquons tout d'abord que la restauration avec une PSF gaussienne variable en profondeur offre des résultats légèrement meilleurs par rapport à la restauration avec une seule PSF gaussienne.

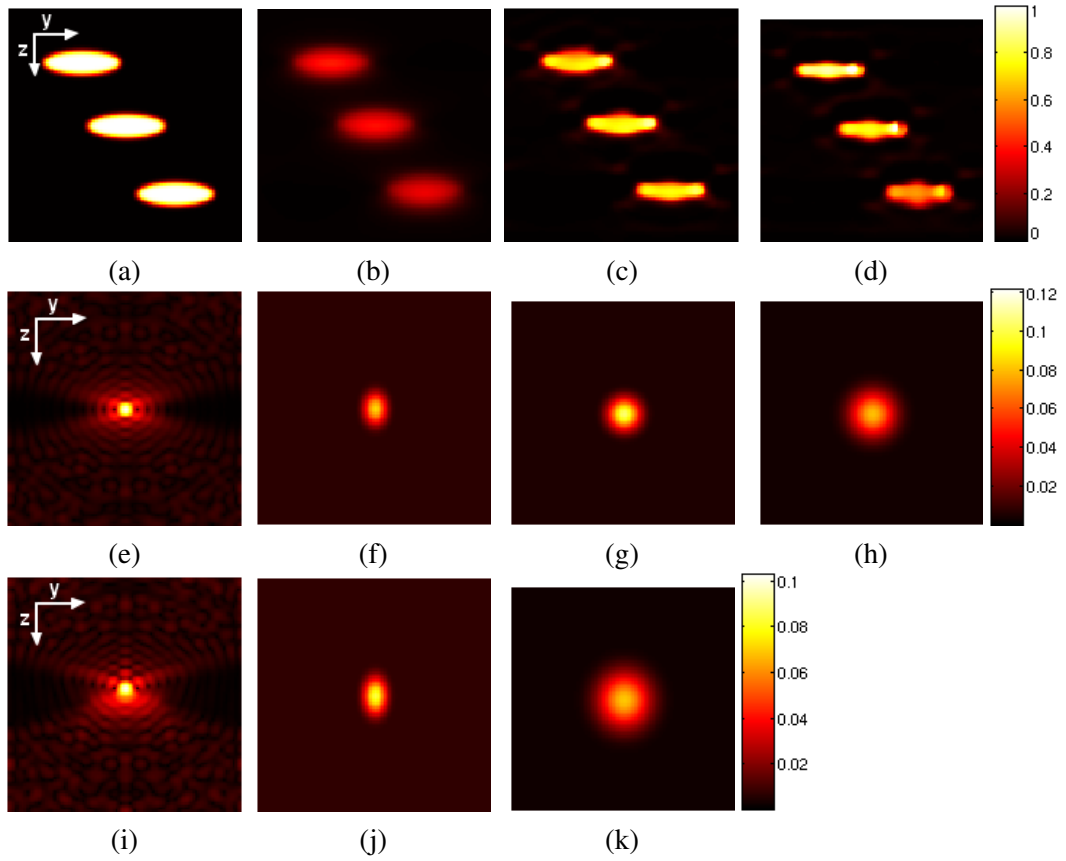


FIGURE 3.9 – Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée** de l’image A, image simulée d’un système CLSM de trois billes : uniquement des coupes axiales (Y, Z) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec une PSF gaussienne variable en profondeur, (d) restauration avec une PSF gaussienne SI, (e) vraie PSF  $h^1$ , (f) première PSF gaussienne utilisée à l’initialisation, (g) première PSF gaussienne estimée  $h^G_{\hat{\theta}_1}$ , (h) PSF gaussienne SI estimée par un algorithme de déconvolution aveugle, (i) vraie PSF  $h^2$ , (j) seconde PSF gaussienne utilisée à l’initialisation, (k) seconde PSF gaussienne estimée  $h^G_{\hat{\theta}_2}$ .

	Image A		Image B	
	SI	SV	SI	SV
RRE (%)	25.52	21.25	-	-
SSIM	0.82	0.85	-	-
Mesure Q	0.0717	0.0777	0.0709	0.0950
$t_g$ (min)	10.64	18.5	21.60	50

TABLE 3.3 – Restauration des images simulées de microscopie confocale par des PSFs gaussiennes.

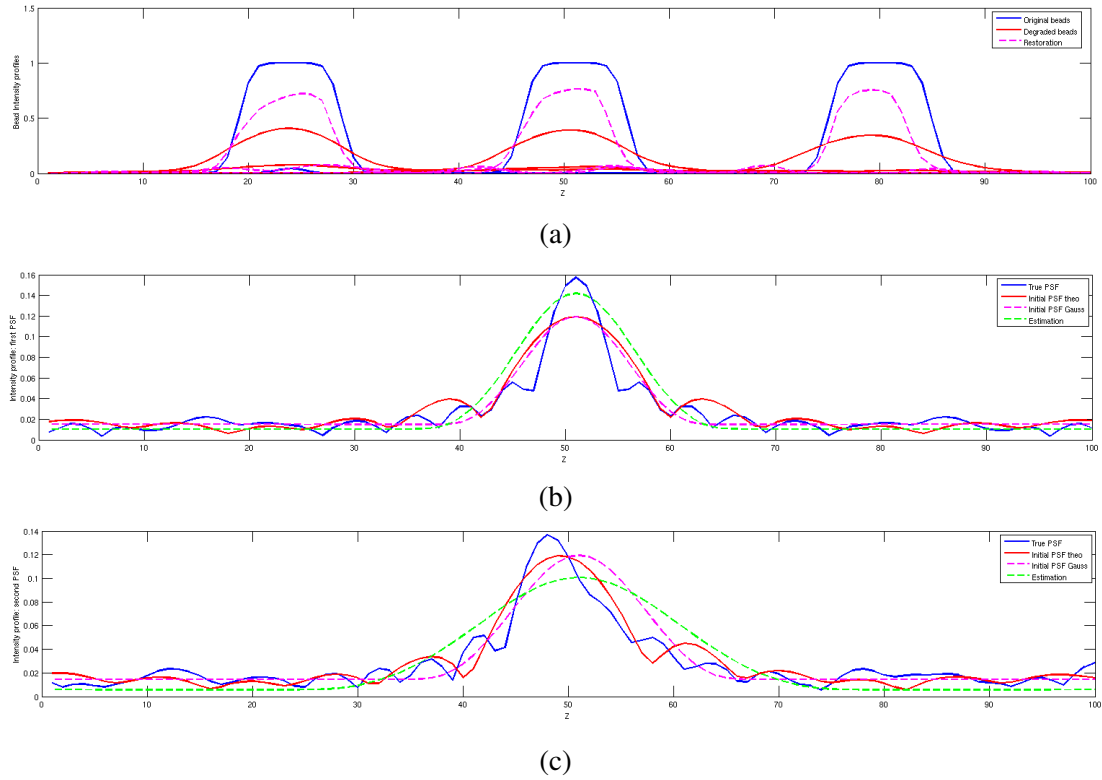


FIGURE 3.10 – (a) Profils d'intensité de l'image A le long de l'axe ( $OZ$ ) passant par les centres des trois billes originales (en bleu), des billes dégradées (en rouge), des billes restaurées avec une combinaison de deux PSFs gaussiennes (en rose). (b) et (c) Profils d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) des PSFs prises respectivement en haut ( $d = 0\mu m$ ) et en bas ( $d = 14,5\mu m$ ) de l'échantillon. Les vraies PSFs sont présentées en bleu, les PSFs théoriques utilisées pour l'initialisation sont présentées en rouge, les PSFs gaussiennes (i.e. approximations des PSFs théoriques précédentes) utilisées dans l'initialisation sont présentées en rose, les PSFs gaussiennes estimées avec la méthode paramétrique proposée sont présentées en vert.

	Image C		Image D	
	SI	SV	SI	SV
Mesure Q	1892	1916	814.80	850.37
$t_g$ (min)	19.21	49.10	90.38	279.32

TABLE 3.4 – Restauration des images réelles de microscopie confocale par des PSFs gaussiennes.

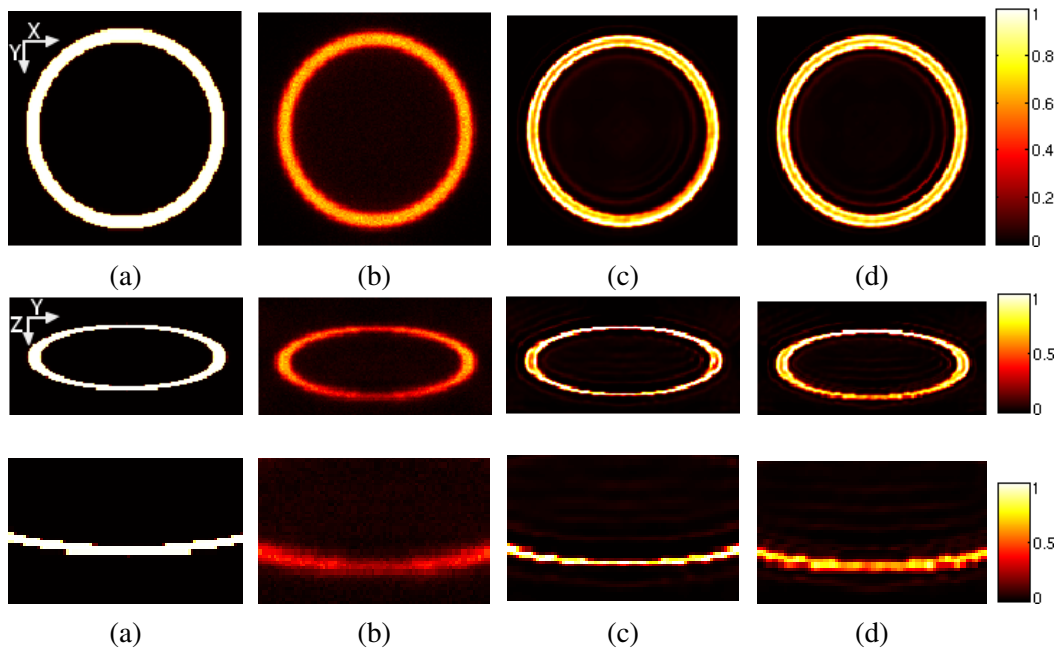


FIGURE 3.11 – Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée** de l'image  $B$ , image simulée d'un système CLSM d'une coquille de bille : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d'une région (en bas de l'échantillon) de la coupe axiale : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec une PSF gaussienne variable en profondeur, (d) restauration avec une PSF gaussienne SI.

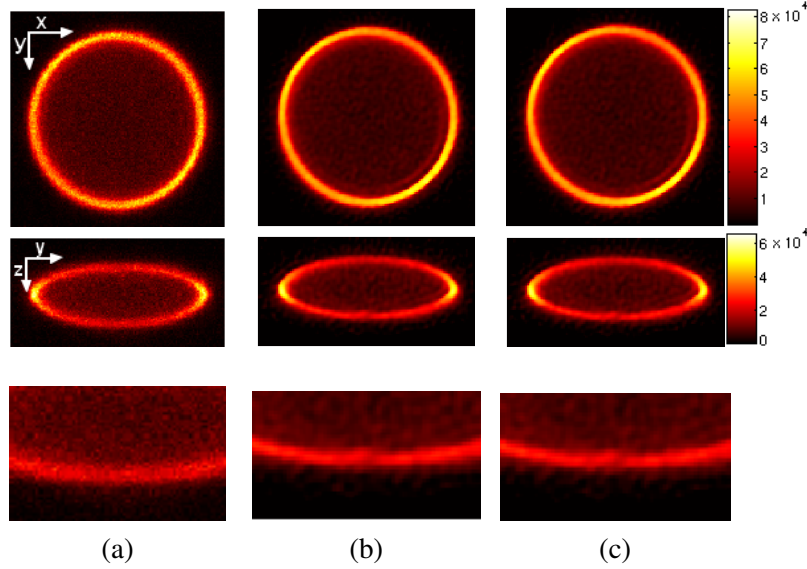


FIGURE 3.12 – Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée** de l’image C, image réelle d’une coquille de bille observée par un microscope confocal Zeiss LSM 780 ©INRA : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées, la dernière ligne montre un zoom d’une région (en bas de l’échantillon) de la coupe axiale : (a) image observée, (b) restauration avec une PSF gaussienne SV, (c) restauration avec une PSF gaussienne SI.

Par ailleurs, en comparant ces résultats à ceux obtenus avec par une PSF non-paramétrée (voir sous-section 3.3.5), nous remarquons que la restauration avec une PSF non-paramétrée est meilleure que la restauration avec une PSF paramétrée par une gaussienne. Le test sur l’image A, par exemple, montre que le lobe principal des PSFs paramétrées estimées (cf. figures 3.9 (g) et (k)) est plus étalé que celui des vraies PSFs (cf. figures 3.9 (e) et (i)), ce qui conduit à un objet étroit (cf. figure 3.9 (c)). Ceci s’explique par le fait que la modélisation gaussienne ne prend pas en compte les rebonds autour du lobe principal des PSFs théoriques. Le lobe principal des PSFs gaussiennes estimées est alors plus étalé que celui des vraies PSFs afin de compenser ces faibles intensités qui ne sont pas modélisées par la fonction gaussienne.

De plus, bien que le nombre d’inconnues est plus réduit dans la deuxième méthode utilisant des PSFs paramétrées que dans la première méthode SGPAM, le temps de calcul n’est pas réduit. En effet, le critère optimisé par rapport au paramètres de la PSF  $\theta$  n’est pas convexe, ce qui nous a obligé à utiliser un algorithme d’optimisation global de recuit simulé qui est lent à converger. L’application de cet algorithme d’une manière itérative ralentit encore les calculs. Dans la première méthode, le critère est convexe par rapport au PSFs  $h^i$ , l’optimisation est effectuée par un algorithme rapide SGP. Notons finalement que dans les deux méthodes paramétrique ou non-paramétrique, le critère global est non convexe, ce qui rend ces algorithmes dépendant de l’initialisation. Les tests que nous avons présenté sur des images réelles et simulées montre que le modèle de Stokseth donne une bonne initialisation des PSFs.

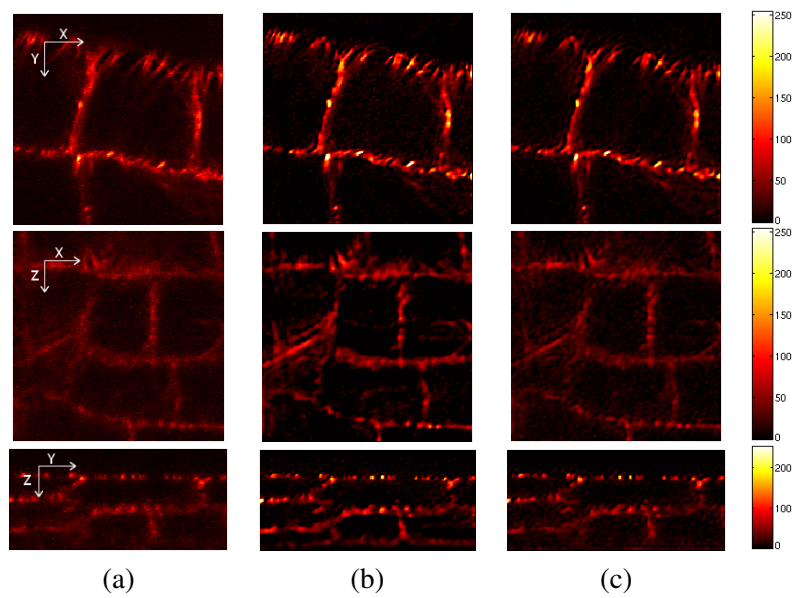


FIGURE 3.13 – Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée** de l'image  $D$ , image biologique réelle de racines de plante observée par un microscope confocal Zeiss LSM 510 ©INRA. La première ligne montre des coupes radiales  $(X, Y)$  à une profondeur de  $5\mu m$ , la deuxième ligne montrent des coupes  $(X, Y)$  à une profondeur de  $10\mu m$  et la troisième ligne montre des coupes axiales  $(Y, Z)$  des images 3D sont présentées : (a) image observée, (b) restauration avec une PSF gaussienne SV, (c) restauration avec une PSF gaussienne SI.

Dans nos tests, les paramètres de régularisation sont fixés par essai/erreur semi-automatique. C'est-à-dire, les valeurs possibles de  $\alpha$  et  $\beta^i$ , sont prédéfinies par l'utilisateur. Pour chaque jeu de paramètres, l'image est restaurée, et la mesure de qualité sans référence  $Q$  est calculée. Le meilleur jeu de paramètre est celui qui maximise la mesure  $Q$ . Dans les tests que nous avons présentés, un nouveau jeu de paramètres est considéré pour chaque image. La stabilité relative de ces paramètres dans un contexte d'acquisition donné demanderait plus d'études et plus de tests sur une variété d'images et serait intéressant à étudier.

### 3.5 Restauration aveugle avec contrainte de support sur l'objet

Pour avoir accès à une information sur le décalage sur les PSFs, il faut introduire des informations supplémentaires extérieures. L'Université de Haute Alsace (UHA) a développé un système de *tomographie diffractive* (TDM pour "Tomographic Diffractive Microscopy" en anglais) couplé à la microscopie de fluorescence confocale. Ce système, décrit en annexe C, permet d'obtenir une image 3D représentant la distribution d'IR relative dans l'objet, à partir de l'onde diffractée par celui-ci. Cette image nous donne aussi une information sur la vraie position axiale de la fluorescence de l'objet (donc une information aussi sur le décalage des PSFs). Nous proposons alors d'extraire le support de l'objet à partir de l'image de tomographie diffractive en utilisant une méthode de segmentation d'image, par exemple [Herberich 2012b] pour ensuite l'injecter comme contrainte dans les méthodes d'estimation précédemment proposées. Nous présentons ici la faisabilité d'une telle approche en introduisant une contrainte de support mais sans l'avoir testée sur un couple d'images de TDM/CLSM. Nous considérons ici que le support de l'objet est connu et nous modifions les méthodes précédentes afin d'incorporer cette contrainte.

#### 3.5.1 Estimation non-paramétrique avec contrainte de support sur l'objet

Soit  $S \subset \mathcal{J}^d$  le support de l'objet supposé connu. Nous modifions l'algorithme SGPAM proposé dans la section 3.3 pour l'estimation jointe des PSFs et l'image. La contrainte de support est introduite dans l'algorithme SGP par projection sur l'ensemble convexe  $\{f, \text{supp}(f) \subset S\}$  :

- Estimation de l'image :

$$\hat{f}^{(k+1)} = \arg \min_f J \left( f, \hat{h}^{1(k)}, \dots, \hat{h}^{M(k)} \right) \quad (3.69)$$

$$sc \begin{cases} f \geq 0, \\ \|f\|_1 = c \\ \text{supp}(f) \subset S \end{cases}$$



– Estimation des PSFs  $h^i, i = 1, \dots, M$  :

$$\hat{h}^{i(k+1)} = \underset{h^i}{\operatorname{ArgMin}} J \left( \hat{f}^{(k+1)}, \hat{h}^{1(k)}, \dots, h^i, \dots, \hat{h}^{M(k)} \right) \quad (3.70)$$

$$sc \begin{cases} h^i \geq 0 \\ \|h^i\|_1 = 1 \\ \operatorname{supp}(h^i) \subset B \end{cases}$$

### 3.5.1.1 Tests numériques

Nous reprenons l'image de coquille de bille de  $5 \mu m$  (Image B) présentée dans le chapitre précédent (cf. figure 3.15 (a)). Nous avons généré numériquement pour cette image un support plus grand que le support réel de l'image afin de se mettre dans un cas réaliste où la connaissance du support est imparfaite (cf. figure 3.14). Nous avons appliqué à cette image l'algorithme SGPAM avec la contrainte de support objet. L'image et les PSFs estimées sont respectivement présentées dans les figures 3.15 (d), (h), (l), et (p). Nous comparons ces résultats à ceux obtenus sans la contrainte de support (voir figures 3.15 (c), (g), (k), et (o)). Afin de mieux voir l'avantage de la contrainte ajoutée, nous montrons dans les figures 3.16, les lignes d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ), passant par le milieu des images restaurées et des PSFs estimées. Ces résultats correspondent à nos attentes : nous obtenons une meilleure estimation de la position de l'objet avec la contrainte de support. Remarquons aussi le décalage des PSFs estimées avec la contrainte de support par rapport à celles estimées sans la contrainte de support. Cependant, étant donnée que le support utilisé est beaucoup plus large que le vrai support de l'objet, l'estimation de la position de l'objet n'est pas optimale car certaines solutions indésirables ne sont pas éliminées. Il faut alors contraindre encore le modèle d'estimation.

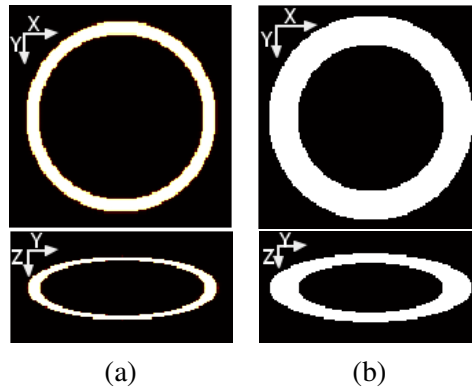


FIGURE 3.14 – Coupes radiale et axiale de l'image simulée de coquille de bille, image B (a), et de son support (b).

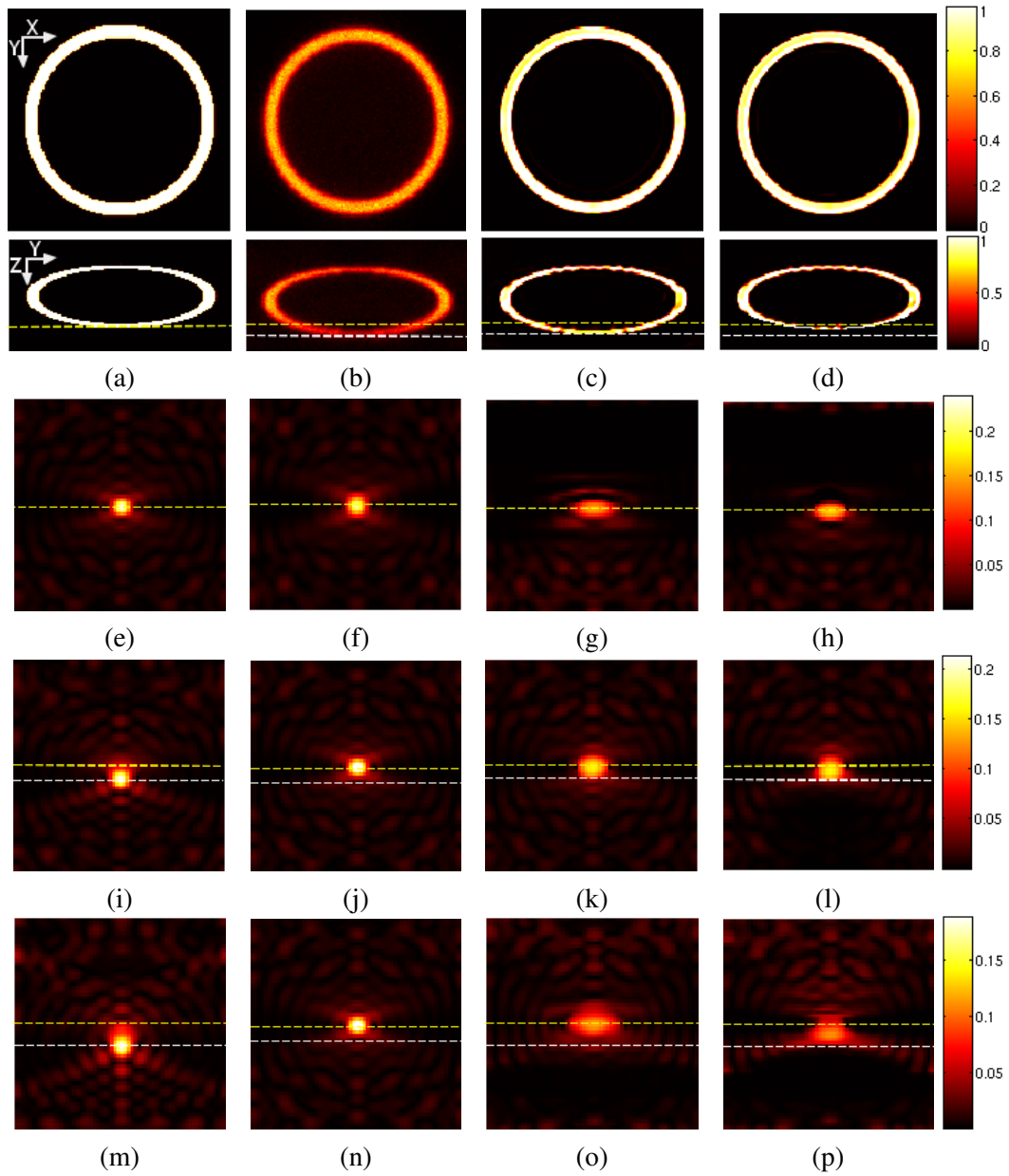


FIGURE 3.15 – Restauration aveugle avec une PSF **non-paramétrée et contrainte de support objet** de l'image  $B$ , image simulée d'un système CLSM d'une coquille de bille : des coupes radiales ( $X, Y$ ) et axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode SGPAM sans contrainte de support objet, (d) restauration avec la méthode SGPAM avec la contrainte de support objet. (e), (i), et (m) montrent des coupes axiales des vraies PSFs, (f), (j), et (n) montrent des coupes axiales des PSF de l'initialisation, (g), (k), et (o) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par SGPAM sans contrainte de support objet, (h), (l), et (p) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par SGPAM avec la contrainte de support objet.

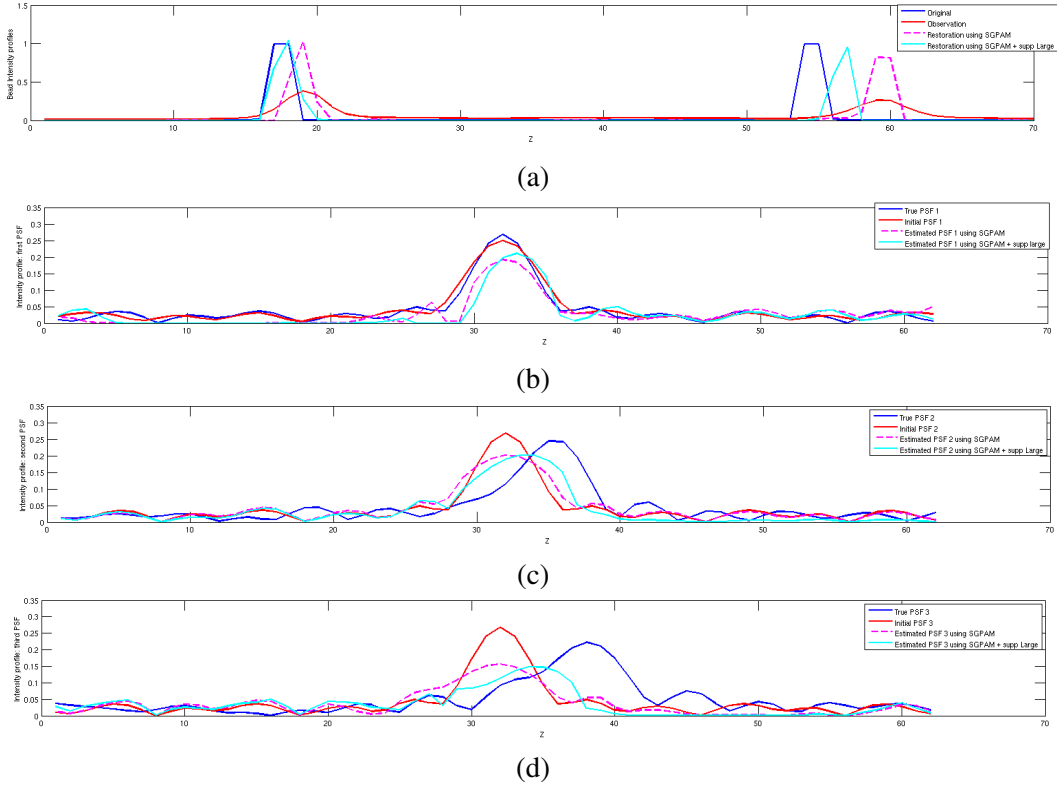


FIGURE 3.16 – (a) Profils d'intensité de l'image B le long de l'axe ( $OZ$ ) passant par le milieu de l'image originale (en bleu), l'image dégradée (en rouge), l'image restaurée par SGPAM sans la contrainte de support objet (en rose), l'image restaurée par SGPAM avec la contrainte de support objet (en bleu ciel). (b), (c), et (d) Profils d'intensité le long de l'axe ( $OZ$ ) des vraies PSFs (en bleu), des PSFs de l'initialisation (en rouge), des PSFs estimées par SGPAM sans la contrainte de support objet (en rose), et des PSFs estimées par SGPAM avec la contrainte de support objet (en bleu ciel).

### 3.5.2 Estimation paramétrique avec contrainte de support sur l'objet

Nous reprenons ici la méthode d'estimation par des PSFs gaussiennes, présentée dans la section 3.4. Nous estimons conjointement l'objet et les paramètres des gaussiennes en introduisant la contrainte de support objet. Chaque PSF SI est modélisée par une fonction gaussienne de la forme suivante :

$$h^G_{\theta_i}(x, y, z) = \frac{1}{c(\sigma_{ri}, \sigma_{zi}, \varepsilon_i, \mu_{zi})} \left[ e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x^2+y^2}{\sigma_{ri}^2} + \frac{(z-\mu_{zi})^2}{\sigma_{zi}^2} \right)} + \varepsilon_i \right], \forall (x, y, z) \in \mathcal{S} \subset \mathbb{R}^3, i = 1, \dots, M \quad (3.71)$$

L'avantage de ce modèle est que le décalage axial des PSFs est explicitement modélisé par le paramètre  $\mu_{zi}$ . Dans la méthode précédente (section 3.4), ce paramètre est mis à zéro ( $\mu_{zi} = 0$ ). Nous estimons ici ce paramètre en imposant des contraintes sur celui-ci. En particulier, nous pouvons imposer le sens du décalage qui peut être déduit à partir de l'image de tomographie diffractive. En effet, cette dernière nous ne donne pas la valeur absolue de l'IR dans le spécimen mais nous donne une indication sur la variation de celui-ci. À partir de cette variation d'IR, nous pouvons déduire le sens du décalage de la PSF. Considérons par exemple un système optique à deux couches d'IR respectifs  $n_1$  et  $n_2$ . Lorsque  $n_1 \leq n_2$ , nous avons d'après la loi de Snell-Descartes (i.e.  $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$ , où  $\theta_1$  et  $\theta_2$  sont les angles que font les rayons lumineux dans chacun des milieux, avec l'axe optique ( $OZ$ )),  $\theta_1 \geq \theta_2$ . Ceci signifie que le point de focalisation réel se trouve au dessus du point de focalisation théorique (i.e. le point de focalisation dans un système sans sauts d'indices), cf. figure 1.11. Par conséquent, le décalage de la PSF dans le milieu d'indice  $n_2$  est plus grand que le décalage dans le milieu d'indice  $n_1$ . Soient  $h^G_{\theta_1}$  la PSF gaussienne dans le milieu d'indice  $n_1$ , définie par les paramètres  $\theta_1 = (\sigma_{r1}, \sigma_{z1}, \varepsilon_1, \mu_{z1})$  et  $h^G_{\theta_2}$  la PSF gaussienne dans le milieu d'indice  $n_2$ , définie par les paramètres  $\theta_2 = (\sigma_{r2}, \sigma_{z2}, \varepsilon_2, \mu_{z2})$ . Ainsi, si  $n_1 \leq n_2$ , nous avons  $\mu_{z2} \geq \mu_{z1}$ , et vice versa. Ce principe est facilement généralisable à un système optique à  $M$  couches : nous avons alors pour tout  $i = 1, \dots, M-1$ , si  $n_i \leq n_{i+1}$ , alors  $\mu_{zi} \geq \mu_{zi+1}$ . Nous proposons d'imposer cette contrainte par paramétrisation en considérant :

$$\begin{cases} \mu_{z1} = \xi_1^2, \\ \mu_{zi+1} = \mu_{zi} + \xi_{i+1}^2, \text{ pour } i = 1, \dots, M-1 \end{cases} \quad (3.72)$$

pour  $\xi_i \in \mathbb{R}$ . L'estimation des PSFs est alors réalisée comme précédemment par un algorithme de recuit simulé appliqué aux variables  $\theta = \{(\omega_i, \eta_i, \varepsilon_i, \xi_i), i = 1, \dots, M\}$  et l'estimation de l'objet est réalisé par l'algorithme SGP en imposant la contrainte de support sur l'objet, ce qui permet de limiter l'intervalle de variation du paramètre  $\xi_i$  :

– Étape 1 : Estimation de l'image :

$$\hat{\mathbf{f}}^{(k+1)} = \arg \min_{\substack{\mathbf{f} \geq 0, \\ \|\mathbf{f}\|_1 = c, \\ \text{supp}(\mathbf{f}) \subset S}} J(\mathbf{f}, \hat{\boldsymbol{\theta}}^{(k)}) \quad (3.73)$$

– Étape 2 : Estimation des paramètres de la PSF :

$$\hat{\theta}^{(k+1)} = \arg \min_{\theta \in \mathbb{R}^{2M}} J(\hat{f}^{(k+1)}, \theta) \quad (3.74)$$

### 3.5.2.1 Tests numériques

Nous avons appliqué cette méthode d'estimation à l'image simulée de coquille de bille, image B (cf. figure 3.17 (b)). Les résultats d'estimation de l'image et des trois PSFs sans et avec la contrainte de support objet sont respectivement présentés dans les figures 3.17 (c), (g), (k) et (o) et les figures 3.17 (d), (h), (l) et (p). Ces premiers résultats montrent une légère amélioration de l'estimation du décalage des PSFs et de la position de l'objet avec la contrainte de support objet. La contrainte de support ne permet qu'améliorer l'estimation de la position de l'objet et du décalage des PSFs. Une contrainte plus forte est indispensable afin d'obtenir une estimation plus précise.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons proposé deux méthodes pour la restauration aveugle des images de microscopie de fluorescence, tout en prenant en compte la variabilité du flou en profondeur par l'utilisation d'une combinaison convexe d'un ensemble de PSFs SI. Dans ces deux méthodes, les positions et les fonctions de pondération étant fixées par l'utilisateur, nous avons conjointement estimé l'image et l'ensemble des PSFs SI en minimisant un critère découlant d'une approche par maximum a posteriori joint. Dans la première méthode, nous n'avons considéré aucune paramétrisation des PSFs, celles-ci sont estimées en tout point de leur volume afin d'autoriser une grande liberté sur la forme des PSFs. Dans la deuxième méthode, la forme des PSFs est contrainte par une paramétrisation par une fonction gaussienne, ceci dans le but de minimiser le nombre de paramètres à estimer. Cette modélisation gaussienne contraint la forme des PSFs et ne permet de modéliser que le lobe central de la PSF abérrée, les rebonds autour de celui-ci ne sont pas modélisés. Les tests numériques sur des images simulées et réelles de microscopie confocale que nous avons présentés montrent que la première approche est meilleure de point de vue qualité de restauration et temps de calcul. En effet, bien que le nombre de paramètres à estimer est réduit dans la deuxième méthode, la non-convexité du critère à optimiser nous amène à utiliser un algorithme de recuit simulé dans une procédure itérative, ce qui ralentit les calculs.

Nous avons ensuite introduit une contrainte de support sur le spécimen, celle-ci peut être obtenue à partir d'un système de tomographie diffractive couplé avec la microscopie de fluorescence confocale. Les premiers tests sur des images simulées ont montrés une légère amélioration de la reconstruction de la position de l'objet par rapport à la méthode d'estimation sans la contrainte de support objet. Il serait intéressant de voir le résultat d'une telle approche sur un couple d'images réelles TDM/CLSM.

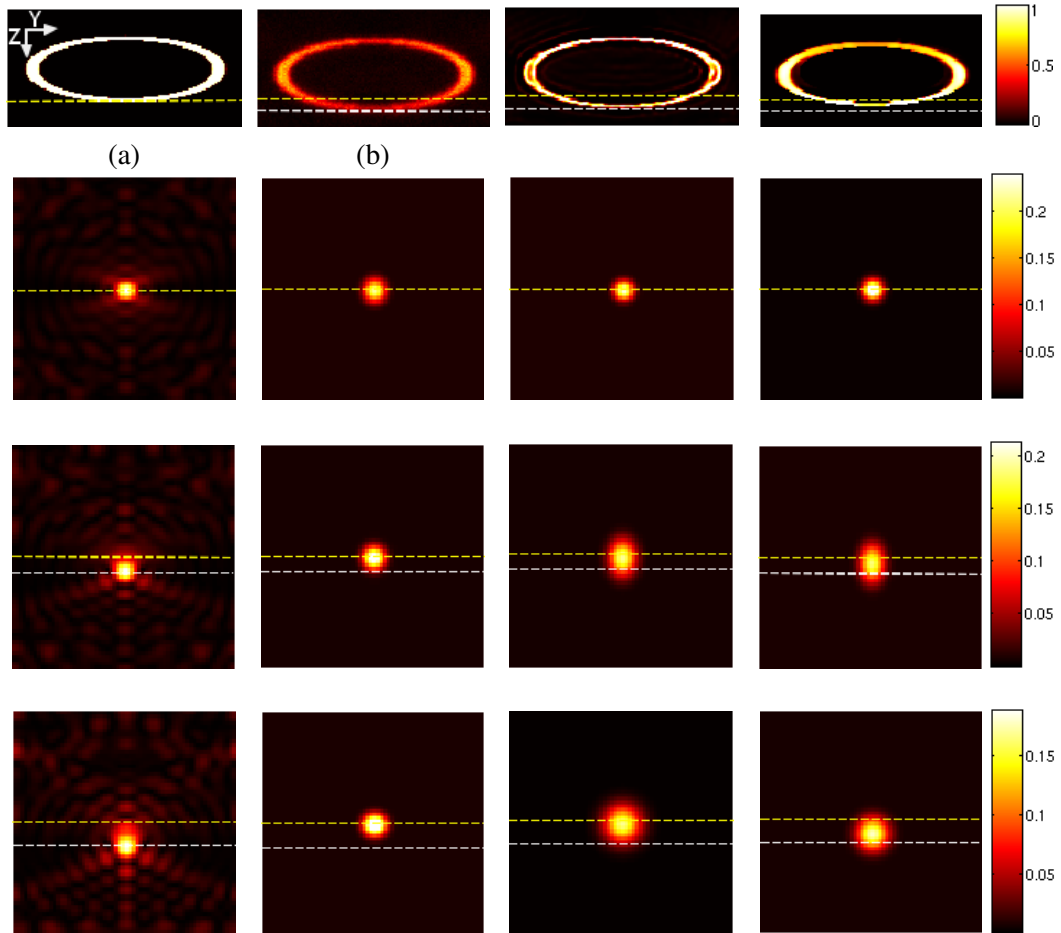


FIGURE 3.17 – Restauration aveugle avec une PSF **paramétrée et contrainte de support objet** de l'image  $B$ , image simulée d'un système CLSM d'une coquille de bille : des coupes axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec la méthode paramétrique sans contrainte de support objet, (d) restauration avec la méthode paramétrique avec la contrainte de support objet. (e), (i), et (m) montrent des coupes axiales des vraies PSFs, (f), (j), et (n) montrent des coupes axiales des PSF gaussienne de l'initialisation, (g), (k), et (o) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par la méthode paramétrique sans contrainte de support objet, (h), (l), et (p) montrent des coupes axiales des PSFs estimées par la méthode paramétrique avec la contrainte de support objet.

# Conclusion générale et perspectives

---

## 4.1 Résumé

Cette thèse nous a permis de mettre en oeuvre diverses méthodes pour la restauration non-aveugle et aveugle d'image 3D de microscopie de fluorescence présentant un flou variant en profondeur, dû aux aberrations optiques.

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet des aberrations optiques sur la PSF et nous avons montré que cette dernière est d'autant plus déformée et décalée du plan central que la variation d'IR et la profondeur du point imagé sont élevées. Nous avons étudié l'approximation de la PSF par une fonction gaussienne. Nous avons montré que ce modèle gaussien nous donne une faible erreur d'approximation en correctement modélisant le lobe principal de la PSF.

Comme l'utilisation d'une PSF différente en tout point de l'image est rédhibitoire en temps de calcul, nous avons étudié les modèles d'approximation du flou SV et choisi un modèle dans lequel la PSF variable en profondeur est représentée par une combinaison convexe de quelques PSFs prises à différentes profondeurs. Nous en avons étudié l'erreur d'approximation. Nous avons ensuite inversé ce modèle en utilisant deux méthodes rapides d'optimisation de critère résultant d'une approche de MAP. Dans la première méthode, nous avons considéré un critère lié au bruit poissonien présent dans les images de microscopie confocale. Nous l'avons optimisé par une méthode SGP assurant une convergence relativement rapide vers un optimum du critère. Dans la deuxième méthode, nous avons considéré un critère lié au bruit gaussien dans les images de microscopie à champ large. Nous avons optimisé ce critère sur les différents régions de l'image d'une manière parallèle en utilisant la méthode de Fornasier et al [Fornasier 2009a]. Nous avons ensuite comparé ces méthodes avec une méthode de l'état de l'art (EMMA) en termes de temps de calcul et de qualité de restauration. Nous avons montré que nos méthodes sont plus rapides que la méthode EMMA et offrent une qualité de restauration légèrement supérieure que cette dernière.

Nous avons ensuite proposé deux méthodes de restauration aveugle où l'image et les PSFs SI sont conjointement estimées en minimisant un critère MAPJ. Dans la première méthode, les intensités des PSFs SI sont estimées en chaque voxel de leur support, ce qui permet de laisser une grande liberté sur la forme de celles-ci. Dans la deuxième méthode, les PSFs sont modélisées par des fonctions gaussiennes. L'estimation des PSFs se réduit alors à l'estimation de leurs paramètres. Ceci réduit également l'espace des solutions possibles, et contraint la forme des PSFs. La comparaison de ces deux approches d'estimation sur des images simulées et réelles de microscopie confocale montre que la

première approche est meilleure en qualité de restauration et en temps de calcul. En effet, le modèle gaussien ne permet pas de modéliser les rebonds autour du lobe principal de la PSF théorique. Un mélange de gaussiennes pourrait améliorer la modélisation mais augmente le nombre de paramètres à estimer. Par ailleurs, les paramètres des PSFs gaussiennes sont optimisés par un algorithme de recuit simulé à cause de la non-convexité du critère par rapport à ces paramètres, ce qui explique la lenteur de cette méthode par rapport à la première.

Nous avons systématiquement testés ces différentes méthodes sur deux images simulées et deux images réelles. Pour tirer des conclusions plus définitives, il faudrait avoir à disposition un plus grand nombre d'images réelles et de spécimens biologiques pour les tests.

## 4.2 Perspectives

Différentes perspectives peuvent étendre ce travail de recherche :

### 4.2.1 Restauration aveugle par extraction de la phase

Le problème d'estimation aveugle étant sous-déterminé, il est important d'injecter le plus d'information possible sur les variables. Les PSFs en particulier proviennent de la modélisation de l'optique en microscopie de fluorescence (cf. cadre 1). Cette modélisation permet d'incorporer des contraintes sur la PSF dans l'espace de Fourier, des contraintes de phase dont le support est donné par l'ouverture numérique de l'objectif qui est connue. Il est alors intéressant d'imposer ces contraintes sur les PSFs dans la méthode d'estimation.

Nous proposons ici de reprendre l'algorithme non-paramétrique présenté dans la section 3.3, et d'y ajouter une étape d'estimation de la phase par un algorithme de Gerchberg-Saxton (GS) [Fienup 1982, Hanser 2003] permettant l'introduction de la contrainte de support sur la phase. Nous présentons des premiers résultats sur une image simulée de microscopie confocale montrant l'intérêt de la prise en compte de cette contrainte supplémentaire.

Pour ce faire, nous rappelons tout d'abord les contraintes données par la modélisation du système optique. Nous décrivons ensuite l'algorithme que nous proposons pour l'injection de ces contraintes. Nous présentons des premiers résultats sur une image simulée. Nous proposons enfin des perspectives permettant d'améliorer cette méthode.

#### 4.2.1.1 Contrainte de phase sur la PSF

Nous considérons un système de microscopie confocale où chaque PSF  $h^i, i = 1, \dots, M$  prise à une profondeur donnée, est modélisée par [Egner 2006] :

$$h^i(x, y, z) = |h_A^i(x, y, z)|^4$$

De plus, nous avons :

$$h_A^i(x, y, z) = TF_{2D}^{-1}(P^i(k_x, k_y, z))$$



où  $P^i(k_x, k_y, z) \in \mathbb{C}$  est la fonction pupille 2D pour chaque coupe en  $Z$ , et  $k_x, k_y$  sont les coordonnées fréquentielles 2D. Cette fonction peut être décomposée en deux termes :

$$P^i(k_x, k_y, z) = P_a^i(k_x, k_y) P_d(k_x, k_y, z)$$

où  $P_d(k_x, k_y, z) = \exp\left(2j\pi z \sqrt{\left(\frac{n_i}{\lambda}\right)^2 - (k_x + k_y)^2}\right)$  modélise la défocalisation de l'optique et est connu (donné la longueur d'onde  $\lambda$ , et l'IR  $n_i$  du milieu d'immersion qui sont supposé connus). Le terme  $P_a^i(k_x, k_y) \in \mathbb{C}$  lié au spécimen biologique (donc inconnu), décrit les aberrations que subit le front d'onde en traversant des milieux d'indices de réfraction différents. Le support  $C$  de ce terme est un disque de rayon donné par l'ouverture numérique ( $NA$ ) du microscope :  $C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{N}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < \frac{2\pi}{\lambda} NA\}$ . Cette modélisation permet d'imposer des contraintes supplémentaires sur les PSF (forme et support).

#### 4.2.1.2 Algorithme d'estimation avec contrainte de phase sur la PSF

Pour prendre en compte ces contraintes de phase, nous ajoutons à l'algorithme d'estimation non-paramétrique proposé dans la section 3.3 une étape d'estimation de la fonction complexe  $h_A^i$ , et plus particulièrement du terme  $P_a^i$ , les autres termes étant fixés par le système d'acquisition. Pour estimer le terme  $P_a^i$  à partir des  $h^i$  (fonctions réelles), nous utilisons l'algorithme de Gerchberg-Saxton (GS) qui a été précédemment appliqué avec succès dans [Hanser 2003] en microscopie de fluorescence à champ large. L'estimation est obtenue en alternant des contraintes dans les domaines spatial (module de  $h_A^i$  donné par  $h^i$ ) et fréquentiel (structure de  $h_A^i$  donnée et support de  $P_a^i$  donné par  $C$ ). L'algorithme d'estimation global est alors le suivant,  $k$  étant le compteur d'itération :

1. Estimation de l'objet par l'algorithme SGP [Bonettini 2009] :

$$\hat{f}^{(k+1)} = \arg \min_{\substack{\|f\|_1 = c \\ f(j) \geq 0, j \in \mathcal{J}^d}} J\left(f, \hat{h}^{(k)}, \dots, \hat{h}^{(k)}\right)$$

2. Estimation des PSFs : pour chaque  $i = 1, \dots, M$ , itérer les étapes suivantes :

- (a) Estimation de la PSF en intensité par l'algorithme SGP [Bonettini 2009] :

$$\hat{h}^{i(k+1)} = \arg \min_{\substack{\|h^i\|_1 = 1 \\ h^i(j) \geq 0, j \in \mathcal{J}^d \\ \text{supp}(h^i) \subset B}} J\left(\hat{f}^{(k+1)}, \hat{h}^{(k)}, h^i, \dots, \hat{h}^{(k)}\right)$$

- (b) Estimation du terme d'aberration  $P_a^i(k_x, k_y)$  à partir de la PSF  $h^i$  par l'algorithme GS [Hanser 2003] ci-dessous.
- (c) Calcul de la PSF  $h^i$  à partir du terme d'aberration :

$$h^i(x, y, z) = |TF_{2D}^{-1}(P_d(k_x, k_y, z) P_a^i(k_x, k_y))|^4$$

L'algorithme GS [Hanser 2003] permet l'estimation de  $P_a^i$  en alternant des contraintes dans les domaines spatial (module de  $h_A^i$  donné par  $h^i$ ) et fréquentiel (support de  $P_a^i$  donné par  $C$ ) comme suit :

1. Calculer pour chaque coupe en  $z$  la PSF cohérente par l'équation suivante :

$$h_A^{i(k+1)}(x, y, z) = TF_{2D}^{-1} \left( P_d(k_x, k_y, z) \cdot P_a^{i(k)}(k_x, k_y) \right)$$

2. Remplacer le module de  $h_A^{i(k+1)}$  par  $\sqrt[4]{\hat{h}^{i(k+1)}}$
3. Calculer pour chaque coupe  $z$  le terme :

$$P_{a_z}^{i(k+1)}(k_x, k_y) = TF_{2D} \left( h_A^{i(k+1)}(x, y, z) \cdot P_d^{-1}(k_x, k_y, z) \right)$$

ensuite calculer  $P_a^{i(k+1)}$  comme étant la moyenne de ces termes calculées pour les différentes  $z$ .

4. Projeter  $P_a^{i(k+1)}$  sur l'ensemble des fonctions de support inclus dans  $C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{N}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < \frac{2\pi}{\lambda} NA\}$ .

#### 4.2.1.3 Tests numériques

Nous avons appliqué l'algorithme ci-dessus à l'image simulée de coquille de bille considérée précédemment (cf. la figure 4.1), les paramètres de régularisation étant fixés comme suit :  $\alpha = 10^{-3}$ ,  $\beta^1 = 4 \cdot 10^4$ ,  $\beta^2 = 5 \cdot 10^5$ ,  $\beta^3 = 5 \cdot 10^5$ . Les PSFs et l'image estimées sont respectivement présentées dans les figures 4.1 (c), (g), (k) et (o). La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sans la contrainte de phase (cf. figures 3.15 (c), (g), (k) et (o)) et la comparaison avec les vraies image et PSFs (cf. figures 4.1 (a), (e), (i), et (m)) montrent l'avantage de l'approche proposée. La méthode GS permet de contraindre la forme de la PSF qui est proche de la vraie PSF : les oscillations autour du lobe principal des PSFs sont mieux modélisées. Ceci est grâce à la contrainte de support dans Fourier qui revient à convoluer la PSF dans le domaine spatial par un *sinc*. Nous présentons aussi dans les figures 4.1 (d), (h), (l) et (p), les résultats de restauration en ajoutant la contrainte de support objet à cette méthode. Ceux-ci montrent une légère amélioration de l'estimation du décalage des PSFs.

Cependant, l'estimation par l'algorithme proposé présentent certaines limites. La projection dans le domaine fréquentiel, effectuée séparément de l'algorithme d'optimisation par SGP, peut augmenter la fonctionnelle d'énergie après son optimisation par rapport à la PSF et à l'image, ce qui déstabilise l'algorithme d'optimisation global. Ceci peut être évité en incorporant les contraintes de phase dans l'algorithme d'optimisation par SGP, ce qui permet d'effectuer une descente de la fonctionnelle tout en vérifiant les contraintes que nous souhaitons imposer sur les PSFs. Une autre manière pour injecter ces contraintes sur la PSF est de reparamétriser la fonctionnelle à optimiser en injectant la contrainte de support fréquentielle par l'utilisation d'une fonction indicatrice. Le critère peut être ensuite optimisé par rapport à la phase d'aberration et l'objet conjointement.

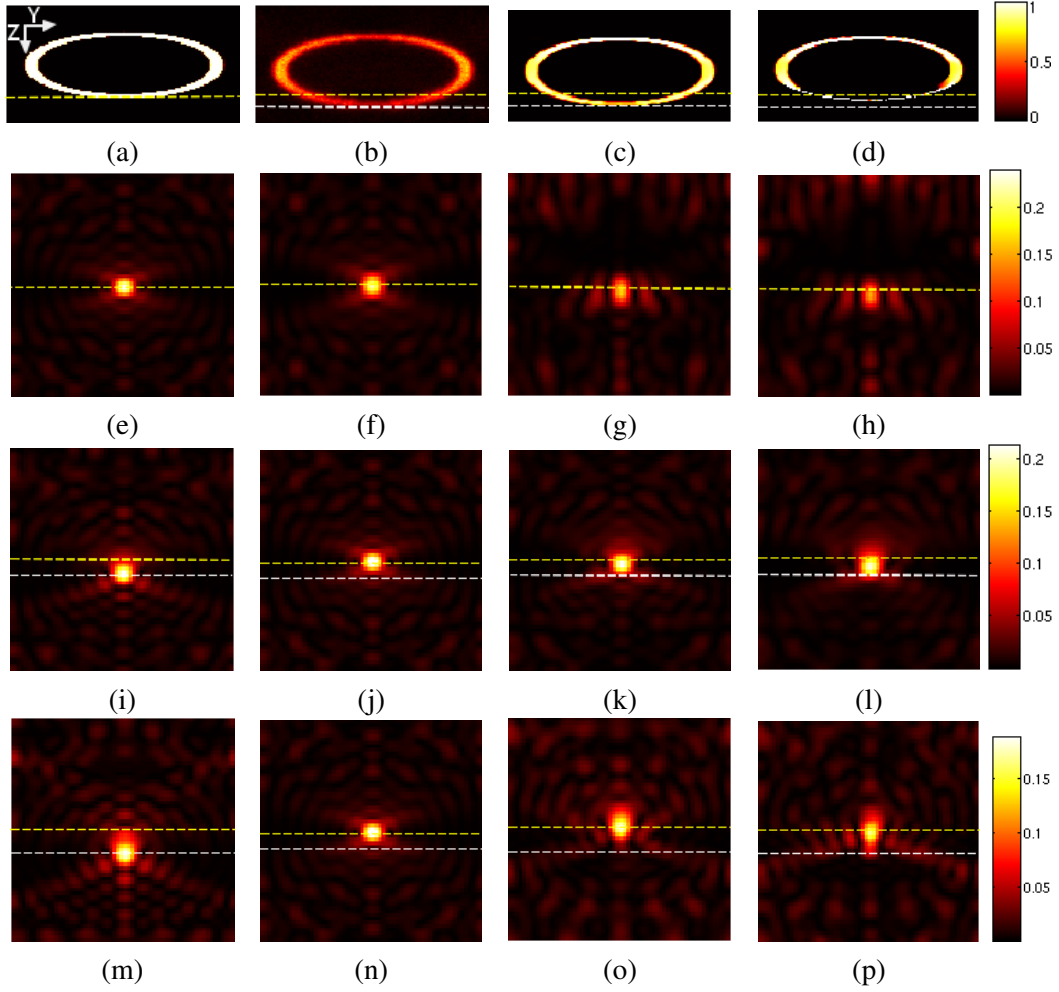


FIGURE 4.1 – Restauration aveugle de l'image  $B$  avec **contrainte de phase sur la PSF** : des coupes axiales ( $Y, Z$ ) des images 3D sont présentées : (a) image originale, (b) observation, (c) restauration avec contrainte de phase sur la PSF, (d) restauration avec contrainte de phase sur la PSF et contrainte de support sur l'objet. (e), (i), et (m) montrent des coupes axiales des vraies PSFs, (f), (j), et (n) montrent des coupes axiales des PSF de l'initialisation, (g), (k), et (o) montrent des coupes axiales des PSFs estimées avec contrainte de phase sur la PSF, (h), (l), et (p) montrent des coupes axiales des PSFs estimées avec contrainte de phase sur la PSF et contrainte de support sur l'objet.

#### 4.2.2 Estimation des hyperparamètres

Les méthodes d'estimation aveugle que nous avons proposées dépendent des paramètres de régularisation  $\alpha, \beta^i, i = 1, \dots, M$ . Nous avons proposé de les ajuster par la maximisation d'une mesure de qualité sans référence  $Q$  qui se fait par exploration systématique des valeurs possibles prédéfinies. Cette méthode nécessite l'exploration d'un grand ensemble de valeurs de  $\alpha, \beta^i$  possibles pour la maximisation de la mesure  $Q$ . Ceci est très coûteux en temps de calcul car pour chaque jeu de paramètres possible, il faut faire

tourner l'algorithme d'estimation aveugle. Il pourrait être intéressant de développer une méthode plus rapide pour l'estimation des paramètres de régularisation. Dans le paragraphe 2.2.3, nous avons discuté quelques unes de ces méthodes qui ont été proposées pour l'estimation d'un seul paramètre de régularisation. Parmi ces méthodes, les méthodes stochastiques nous semblent les plus adaptées à notre problème d'estimation d'un grand nombre de paramètres. Par exemple, nous pouvons appliquer la méthode de maximum de vraisemblance proposée dans [Chaux 2012] ou encore la méthode proposée dans [Orioux 2009] pour des critères comportant des normes  $l_1$  et  $l_2$ . L'extension de ces méthodes à la statistique de bruit de Poisson est possible en effectuant une approximation quadratique du terme d'attache aux données poissonien [Bardsley 2009].

#### 4.2.3 Estimation de la position de l'objet et utilisation de la tomographie diffractive

Afin d'améliorer l'estimation de la position de l'objet (et aussi du décalage des PSFs), nous avons introduit une contrainte de support objet qui peut être obtenue à partir de l'image de tomographie diffractive. Une autre approche possible est de chercher la transformation qui existe entre l'image de tomographie diffractive et l'image de microscopie de fluorescence, par exemple par l'utilisation d'un algorithme de recalage d'image [Zitova 2003]. Ce recalage peut être effectué après la restauration ou au même temps que la restauration en définissant un terme d'attache aux données de la forme suivante :

$$J(f, \tilde{H}) = \sum_{i \in \mathcal{J}^d} \tilde{H}(Tf)(i) + b_g - g(i) \cdot \log \left( \tilde{H}_\theta(Tf)(i) + b_g \right) \quad (4.1)$$

où  $T$  est la transformation entre l'image de tomographie diffractive et l'image de fluorescence.

#### 4.2.4 Algorithmes rapides d'optimisation

Dans le second chapitre de ce manuscrit, nous avons présenté une méthode rapide fondée sur une technique de décomposition de domaine [Fornasier 2009a] pour l'optimisation d'un critère dans lequel le terme d'attache aux données est quadratique. Étant donné sa rapidité de calcul, il pourrait être intéressant d'étudier l'extension de cette méthode au bruit poissonien présent dans les images de microscopie confocale. Ceci pourrait être réalisable par l'utilisation d'une approximation quadratique du terme d'attache aux données poissonien [Bardsley 2009].

#### 4.2.5 Extension à d'autres applications

Dans ce travail, nous avons considéré uniquement une variation du flou en profondeur (i.e. suivant l'axe  $(OZ)$ ), ce qui correspond à une distribution d'IRs en couches. Néanmoins, tous nos algorithmes sont facilement extensibles à des images avec une variation du flou dans n'importe quelle autre direction et peuvent être facilement adaptés à des spécimens hétérogènes où le flou n'est pas uniquement variable en profondeur. En effet, nos algorithmes sont programmés pour des images 2D et 3D afin de prendre en compte n'importe

---

quelle direction de variation de flou choisie par l'utilisateur. Il suffit de choisir des fonctions de pondération adéquates à la variation du flou considérée. Nous avons déjà appliqué nos algorithmes sur des images 2D de caméra affectées par les aberrations sphériques dans lesquelles le flou varie en couronne à cause de la forme sphérique des lentilles, les fonctions de pondération choisies sont alors variables de façon circulaire du centre aux bords de l'image. Il pourrait être intéressant d'appliquer nos algorithmes sur d'autres types d'images, par exemples des images astrophysiques.



# Calcul du gradient

Nous donnons ici l'expression du gradient des termes régularisation ainsi qu'une décomposition de cette expression en deux termes positifs utilisés dans l'algorithme SGP. Les termes de régularisation considérés dans cette thèse sont de la forme suivante pour des images discrète 3D  $X \in \mathbb{R}^{n_x} \times \mathbb{R}^{n_y} \times \mathbb{R}^{n_z}$  :

$$J^R(X) = \sum_{(x,y,z)} \phi(D^2(x,y,z)) \quad (\text{A.1})$$

où  $D^2(x,y,z) = \frac{1}{2} |(\nabla X)(x,y,z)|^2$  et le gradient  $(\nabla X)(x,y,z)$  est exprimé comme suit :

$$(\nabla X)(x,y,z) = \begin{bmatrix} X(x+1,y,z) - X(x,y,z) \\ X(x,y+1,z) - X(x,y,z) \\ X(x,y,z+1) - X(x,y,z) \end{bmatrix} \quad (\text{A.2})$$

avec  $X(n+1,y,z) = X(1,y,z)$ ,  $X(x,n+1,y) = X(x,1,y)$ , et  $X(x,y,n+1) = X(x,y,1)$ .

$D^2(x,y,z)$  s'écrit alors comme suit :

$$D^2(x,y,z) = \frac{1}{2} [(X(x+1,y,z) - X(x,y,z))^2 + (X(x,y+1,z) - X(x,y,z))^2 + (X(x,y,z+1) - X(x,y,z))^2] \quad (\text{A.3})$$

La fonction  $\phi(t)$  est choisi comme suit :

$$\phi(t) = \begin{cases} 2\sqrt{t + \varepsilon^2}, \forall t \geq 0, \varepsilon > 0, & \text{pour une variation totale} \\ t, \forall t \geq 0, & \text{pour une régularisation de Tikhonov} \end{cases} \quad (\text{A.4})$$

Le paramètre  $\varepsilon$  est un scalaire de très faible valeur afin d'éviter les points de singularité dans la dérivée du terme de variation totale (par exemple, dans nos tests, nous considérons  $\varepsilon = 10^{-8}$  comme suggéré dans [Vogel 2002, Zanella 2009]).

Uniquement les termes  $D^2(x,y,z)$ ,  $D^2(x-1,y,z)$ ,  $D^2(x,y-1,z)$ , et  $D^2(x,y,z-1)$  dépendent de  $X(x,y,z)$ . Le gradient de la régularisation (A.1) par rapport à  $X(x,y,z)$  s'écrit alors comme suit :

$$\begin{aligned} \nabla_{(x,y,z)} J^R(X) = & \phi'(D^2(x,y,z)) (3X(x,y,z) - X(x+1,y,z) \\ & - X(x,y+1,z) - X(x,y,z+1)) \\ & + \phi'(D^2(x-1,y,z)) (X(x,y,z) - X(x-1,y,z)) \\ & + \phi'(D^2(x,y-1,z)) (X(x,y,z) - X(x,y-1,z)) \\ & + \phi'(D^2(x,y,z-1)) (X(x,y,z) - X(x,y,z-1)) \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

avec  $\phi'(t)$  la dérivée  $\phi(t)$ . Une décomposition possible du gradient de  $\nabla_{(x,y,z)} J^R(X)$  en deux termes positifs est la suivante :

$$\nabla(x, y, z) J^R(X) = -U^R(X) + V^R(X) \quad (\text{A.6})$$

avec

$$\begin{aligned} U^R(X) = & \phi'(D^2(x, y, z)) (X(x+1, y, z) \\ & + X(x, y+1, z) + X(x, y+1, z+1)) \\ & + \phi'(D^2(x-1, y, z)) X(x-1, y, z) \\ & + \phi'(D^2(x, y-1, z)) X(x, y-1, z) \\ & + \phi'(D^2(x, y, z-1)) X(x, y, z-1) \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

$$\begin{aligned} V^R(X) = & X(x, y, z) [3\phi'(D^2(x, y, z)) + \phi'(D^2(x-1, y, z)) \\ & + \phi'(D^2(x, y-1, z)) + \phi'(D^2(x, y, z-1))] \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$



# Mesures de qualité

---

Différentes métriques ont été proposées dans la littérature afin d'évaluer la qualité d'une image. Leur utilisation dépend de l'application et du type de dégradation auquel on est intéressé. Nous présentons ici les mesures de qualité que nous utilisons dans cette thèse afin d'évaluer nos résultats de restauration en termes de flou et de bruit. Celles-ci sont divisées en deux classes :

- mesures de qualité avec référence,
- mesures de qualité sans référence.

## B.1 Mesures de qualité avec référence

Ce type de métrique permet de comparer une image estimée  $\hat{f}$  à une image de référence  $f$  dont on dispose. Cette dernière correspond souvent à l'image originale avant dégradation lorsque l'on travaille en simulation. Parmi les métriques les plus couramment utilisées sont celles qui mesurent simplement la distance entre les pixels des images deux à deux comme par exemple l'erreur quadratique moyenne (MSE) ou le rapport signal sur bruit (SNR). Les mesures les plus élaborées sont celles qui prennent en compte le système visuel humain comme par exemple l'indice de similarité structurelle (SSIM). Nous donnons ici quelques unes de ces mesures.

### B.1.1 Erreur quadratique moyenne (MSE)

L'erreur quadratique moyenne ou "Mean Square Error" (MSE) en anglais entre les images  $f$  et  $\hat{f}$  est définie comme suit :

$$\begin{aligned} MSE(f, \hat{f}) &= \|\hat{f} - f\|_2^2 \\ &= \frac{1}{|\mathcal{J}^d|} \sum_{j \in \mathcal{J}^d} (\hat{f}(j) - f(j))^2 \end{aligned} \tag{B.1}$$

### B.1.2 Erreur quadratique moyenne normalisée (NMSE)

Il est parfois utile d'avoir une valeur normalisée de l'erreur quadratique moyenne. Cette mesure que l'on note par NMSE pour "Normalized MSE" est exprimée comme suit :

$$\begin{aligned} NMSE(f, \hat{f}) &= \frac{\|\hat{f} - f\|_2^2}{\|f\|_2^2} \\ &= \frac{\sum_{j \in \mathcal{J}^d} (\hat{f}(j) - f(j))^2}{\sum_{j \in \mathcal{J}^d} (f(j))^2} \end{aligned} \quad (B.2)$$

### B.1.3 Rapport signal sur bruit (SNR)

Le rapport signal sur bruit est un indicateur de qualité très utilisé en traitement d'image pour évaluer le bruit apporté à une image propre. L'abréviation SNR du terme anglais "signal-to-noise ratio" est très courante. Il s'agit du rapport entre la puissance de l'image originale  $f$  et la puissance du bruit  $(\hat{f} - f)$ . Il s'exprime généralement en décibel (dB) comme suit :

$$SNR(f, \hat{f}) = \left\{ 10 \log_{10} \left( \frac{\|f\|_2^2}{\|\hat{f} - f\|_2^2} \right) \right\} (dB). \quad (B.3)$$

Plus ce rapport est élevé, plus l'image est de bonne qualité.

### B.1.4 Rapport signal sur bruit maximal (PSNR)

Le rapport SNR maximale ou PSNR pour "Peak SNR" en anglais est défini comme suit :

$$PSNR(f, \hat{f}) = \left\{ 10 \log_{10} \left( \frac{R^2}{\|\hat{f} - f\|_2^2} \right) \right\} (dB). \quad (B.4)$$

avec  $R$  la valeur maximale des intensités des pixels de l'image (par exemple 255 pour une image codée sur 8 bits). Plus la qualité de l'image est médiocre, plus la valeur du MSE est grande, plus le PSNR est faible. Les valeurs typiques de PSNR pour des images de bonne qualité varient entre 30 et 40 dB.

### B.1.5 Indice de similarité structurelle (SSIM)

Plutôt que calculer la différence d'intensités entre les pixels deux à deux, il est préférable de mesurer la similarité entre deux images en comparant leurs structures, luminances et contrastes. En effet, le système visuel humain est plus sensible aux changements dans la structure globale de l'image, qu'à des changements dans les intensités des pixels deux à deux. L'indice de similarité structurelle ou "Structural SIMilarity index" (SSIM)

[Wang 2004] est le produit de trois fonctions  $S(f, \hat{f})$ ,  $L(f, \hat{f})$ , et  $C(f, \hat{f})$  comparant respectivement la structure, la luminance et le contraste des images  $f$  et  $\hat{f}$  :

$$SSIM(f, \hat{f}) = S(f, \hat{f})^\alpha L(f, \hat{f})^\beta C(f, \hat{f})^\gamma \quad (\text{B.5})$$

$\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  sont des paramètres utilisés pour ajuster l'importance de chacune des composantes par rapport aux autres. En choisissant  $\alpha = \beta = \gamma = 1$ , l'expression du SSIM est donnée par l'équation suivante :

$$SSIM(f, \hat{f}) = \frac{(2\mu_f\mu_{\hat{f}} + c_1)(2\sigma_{ff} + c_2)}{(\mu_f^2\mu_{\hat{f}}^2 + c_1)(\sigma_f^2\sigma_{\hat{f}}^2 + c_2)} \quad (\text{B.6})$$

$\mu_f$  and  $\mu_{\hat{f}}$  sont respectivement les moyennes des valeurs des pixels de  $f$  et  $\hat{f}$ ,  $\sigma_f^2$  et  $\sigma_{\hat{f}}^2$  sont leurs variances et  $\sigma_{ff}$  est la matrice de covariance de  $f$  et  $\hat{f}$ .  $c_1$  et  $c_2$  sont deux constantes pour stabiliser la division quand le dénominateur est à très faible valeur. Celles-ci sont souvent choisies comme suit :  $c_1 = (k_1 R)^2$ ,  $c_2 = (k_2 R)^2$ , avec  $R$  la valeur maximale des intensités des pixels, et  $k_1$  et  $k_2$  deux constantes qui sont choisies comme suit :  $k_1 = 0.01$ ,  $k_2 = 0.03$ .

Plus la valeur du SSIM est proche de 1, plus les images  $f$  et  $\hat{f}$  sont similaires.

## B.2 Mesures de qualité sans référence

Lorsque la vraie image originale est indisponible ou lorsque l'image originale et l'image restaurée ne sont pas recalées, il est indispensable d'utiliser une mesure de qualité sans référence afin d'évaluer nos résultats de restauration. Pour ce faire, nous proposons d'étendre la mesure récemment proposée dans [Zhu 2010] à nos données tridimensionnelles. Cette mesure que l'on note par  $Q$  réagit bien à la présence de bruit et de flou dans l'image. Sa valeur décroît lorsque la variance de bruit et/ou le flou augmente. Un avantage important de cette mesure est qu'elle prend en compte la non-homogénéité des dégradations dans l'image. En effet, l'image  $f$  est décomposée en  $N$  régions  $\mathcal{J}_i^d$ ,  $i = 1, \dots, N$ , et dans chaque région une mesure locale  $Q_i$  est calculée à partir de l'orientation dominante dans cette région. Notons par  $G$  la matrice gradient de cette sous-image :

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} \vdots & \vdots & \vdots \\ f_x(j) & f_y(j) & f_z(j) \\ \vdots & \vdots & \vdots \end{pmatrix} \quad (\text{B.7})$$

avec  $(f_x(j) \ f_y(j) \ f_z(j))^T$  est le vecteur gradient au pixel  $j$ . Comme illustré dans [Zhu 2010], il est possible de déterminer à partir de cette matrice  $\mathbf{G}$  l'orientation dominante dans cette sous-images en effectuant une décomposition en valeurs singulières de  $G$  :

$$\mathbf{G} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V} = \mathbf{U} \begin{pmatrix} s_1 & 0 & 0 \\ 0 & s_2 & 0 \\ 0 & 0 & s_3 \end{pmatrix} (\mathbf{v}_1 \ \mathbf{v}_2 \ \mathbf{v}_3)^T \quad (\text{B.8})$$

où  $s_1$ ,  $s_2$ , et  $s_3$  sont les valeurs singulières de  $\mathbf{G}$  ordonnées par ordre décroissant, et  $\mathbf{U}$  et  $\mathbf{V}$  sont deux matrices orthonormales. Le vecteur colonne  $\mathbf{v}_1$  représente l'orientation dominante dans la région traitée, le deuxième et le troisième vecteurs sont orthogonales à celui-ci, décrivant ainsi l'orientation dominante des bords. Les valeurs singulières  $s_1$ ,  $s_2$ , et  $s_3$  représentent les énergies suivant chacune des directions  $\mathbf{v}_1$ ,  $\mathbf{v}_2$ , et  $\mathbf{v}_3$  respectivement. Ces valeurs donnent une indication sur le niveau de flou et de bruit dans la région considérée. La première valeur singulière  $s_1$  est en particulier directement liée à la netteté dans la région traitée. Plus la sous-image est floue, plus l'énergie de l'orientation dominante  $s_1$  est faible [Zhu 2010]. Afin de prendre en compte le bruit, les auteurs de [Zhu 2010] ont défini un critère appelé *cohérence* qui permet d'approcher l'inverse de la variance du bruit. Ce critère s'étend facilement à des images tridimensionnelles comme suit :

$$C = \frac{s_1 - s_3}{s_1 + s_3} \quad (\text{B.9})$$

Ainsi plus le bruit est important, plus la cohérence  $C$  est faible. Ainsi, d'une manière analogue à l'expression de la mesure  $Q$  pour des images bidimensionnelles [Zhu 2010], nous donnons l'expression suivante pour des images tridimensionnelles :

$$Q = s_1 \frac{s_1 - s_3}{s_1 + s_3} \quad (\text{B.10})$$

Pour les régions isotropes, il n'existe pas de direction dominante ( $s_1 \approx s_2 \approx s_3 \approx 0$ ). Le mesure  $Q$  ne donne pas, dans ce cas, une bonne indication sur le niveau de dégradation (il est montré dans [Zhu 2010] que la cohérence ne jouent plus le rôle de l'inverse de la variance du bruit pour les régions isotropes). Il est alors important de ne pas prendre en compte ces régions isotropes. Ces régions sont évitées par un test basé sur la valeur de la cohérence  $C$  qui permet de décider si la région en question peut être considérée comme isotrope ou pas. Lorsque la valeur de la cohérence  $C$  est inférieure à un seuil fixé  $\tau$  (calculé à partir de la densité de probabilité de  $R$  [Zhu 2010]), la région est supposée isotrope. Ainsi, uniquement  $M < N$  régions anisotropes sont utilisées pour calculer la mesure  $Q$  sur la totalité de l'image :

$$Q = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M Q_i \quad (\text{B.11})$$

où  $Q_i$  est calculée sur une région  $\mathcal{S}_i^d$  par la formule (B.10).

Nous montrons dans ce qui suit quelques tests numériques qui prouvent la sensibilité de la mesure ainsi définie au flou 3D, à la variabilité du flou 3D en profondeur et au bruit de poisson.

### B.2.1 Sensibilité de $Q$ au flou 3D

Considérons l'image originale de trois billes dont une coupe axiale est présentée dans la figure 3.1 (a). Afin de vérifier la sensibilité de la mesure  $Q$  au flou 3D, nous calculons sa valeur pour différents niveaux de flou obtenu en convoluant l'image par une PSF SI calculée par le modèle théorique associé à un microscope confocal. Nous augmentons le flou

en diminuant l'ouverture numérique ( $NA$ ) de l'objectif. Le microscope est supposé sans aberration (la variation d'IRs entre les différentes couches du système est nulle et la profondeur du point imagé étant mise à zéro). Les autres paramètres du système sont fixés comme suit : les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement  $560nm$  et  $600nm$ , les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement fixés à  $50nm$  et  $145nm$ , le diamètre du sténopé du microscope confocal est  $1AU$ . Les valeurs de  $Q$  enregistrées pour les différentes  $NA$  sont données dans la table B.1.

NA	1.4	1.3	1.2	1.1	1	0.9	0.8	0.7
Q	41.286	39.159	36.519	33.187	29.919	26.699	23.531	19.483

TABLE B.1 – Sensibilité de la mesure  $Q$  au flou 3D.

### B.2.2 Sensibilité de la mesure $Q$ au flou 3D variable en profondeur

Après avoir vérifié la sensibilité de la mesure  $Q$  au flou 3D, nous vérifions ici sa sensibilité à la variabilité du flou en profondeur. Pour ce faire, nous considérons la même image et les mêmes paramètres que le test précédent. Nous fixons l'ouverture numérique à 1.4, et l'IR de la lamelle (également l'IR de milieu d'immersion) à 1.515, et nous faisons varier l'IR du spécimen  $n_s$  entre 1 et 1.5 afin d'augmenter/diminuer la variabilité du flou en profondeur. Pour chaque valeur de l'indice  $n_s$ , l'image est dégradée par un flou variable en profondeur comme donnée par l'équation (1.9). Les valeurs données dans la table B.2 montrent bien la sensibilité de  $Q$  à la variabilité du flou en profondeur.

$n_s$	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1
Q	39.462	29.245	23.336	20.490	18.889	18.000

TABLE B.2 – Sensibilité de la mesure  $Q$  à la variabilité de flou 3D.

### B.2.3 Sensibilité de la mesure $Q$ au bruit de Poisson

Nous testons maintenant la sensibilité de  $Q$  au bruit de poisson. Nous considérons la même image que précédemment, dont le flux d'intensité total est 17537. Nous augmentons le bruit en diminuant le flux total de l'image par un facteur  $\alpha$  qui varie entre 0.1 et 1. Dans la table B.3, nous résumons les valeurs de  $Q$  obtenues.

$\alpha$	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	.3	0.2	0.1
Q	51.043	45.224	39.800	33.818	28.296	22.967	17.596	12.272	7.528	3.193

TABLE B.3 – Sensibilité de la mesure  $Q$  au bruit de poisson.

### B.2.4 Sensibilité de la mesure $Q$ au flou SV et au bruit de Poisson conjointement

Nous testons ici la sensibilité de  $Q$  au flou SV et au bruit poissonien conjointement. Comme l'on a fait précédemment, nous augmentons le bruit par la diminution du flux de

l'image par un facteur  $\alpha$  et nous augmentons la variabilité du flou par l'augmentation de la variation de l'IR entre le milieu d'immersion et le spécimen. Dans la table B.4, nous présentons les valeurs de  $Q$  obtenues. Nous précisons que dans cette table le sens d'augmentation du flou variable en profondeur est du haut vers le bas et le sens d'augmentation du bruit est du gauche vers la droite. La mesure  $Q$  décroît de gauche à droite et de haut en bas.

$n_s/\alpha$	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	.3	0.2	0.1
1.5	26.142	22.964	19.894	17.049	13.801	10.927	8.114	5.701	3.245	0.962
1.4	15.973	13.853	11.865	9.980	8.053	6.377	4.652	2.807	1.218	0.195
1.3	10.560	9.046	7.791	6.558	5.250	4.094	2.894	1.380	0.556	0.025
1.2	8.049	6.838	5.899	4.628	3.464	2.819	1.713	0.737	0.167	0.008
1.1	6.967	5.962	5.025	4.192	3.282	2.073	1.170	0.439	0.097	0
1	6.255	5.618	4.370	3.435	2.572	1.753	1.130	0.291	0.040	0

TABLE B.4 – Sensibilité de la mesure  $Q$  à la variabilité du flou 3D et au bruit de poisson conjointement.

# Système de tomographie diffractive

---

La tomographie diffractive est une technique d'imagerie tridimensionnelle qui permet l'enregistrement de l'onde diffractée par l'objet dans le but d'accéder aux propriétés optiques de celui-ci. À l'inverse de l'imagerie de fluorescence, cette technique ne nécessite pas l'injection de fluorochrome dans l'échantillon, l'image est formée à partir de la lumière diffractée par l'objet. Nous présentons ici le principe général de reconstruction d'image de tomographie diffractive. Plus de détails sur le fonctionnement et la mise en oeuvre de cette technique d'imagerie se trouvent dans [Simon 2007, Haeberlé 2010].

## C.1 Reconstruction d'image

La reconstruction d'image de tomographie diffractive se fait en deux étapes :

- la première étape permet l'enregistrement de l'onde diffractée par le spécimen en amplitude et en phase par une technique d'*holographie*,
- la seconde étape permet la reconstruction numérique de l'image 3D.

Nous expliquons ici ces deux étapes de reconstructions.

### C.1.1 Enregistrement de l'onde diffractée :

Étant donné que les capteurs existants ne sont sensibles qu'à des intensités, l'enregistrement de l'onde diffractée par l'objet en amplitude et en phase nécessite la mise en oeuvre d'une technique spécifique qui s'appelle *holographie* [Simon 2007]. Cette technique nécessite l'utilisation d'une onde de référence connue (celle-ci correspond souvent à l'onde d'illumination) qui interfère avec l'onde diffractée que l'on souhaite enregistrer. Notons par  $w_r(u)$  l'onde de référence et par  $w_d(u)$  l'onde diffractée par l'objet (voir figure C.1). Au niveau du capteur, l'intensité enregistrée correspond à l'interférence de ces deux ondes. Cette intensité enregistrée s'appelle *hologramme* et s'exprime comme suit :

$$I(u) = |w_r(u) + w_d(u)|^2 \quad (\text{C.1})$$

Cette mesure seule ne permet pas de remonter à l'amplitude et la phase de l'onde diffractée. Il faut utiliser la technique d'*holographie à décalage de phase* qui consiste à acquérir une série d'hologrammes en effectuant des sauts de phase successifs de l'onde de référence. Soit par exemple une série de 4 hologrammes notés par  $I_0, I_1, I_2$  et  $I_3$  obtenus par un déphasage de  $\frac{\pi}{2}$  entre deux acquisitions successives. L'onde de référence  $w_r$  étant supposée

connue en amplitude et en phase, l'onde diffractée  $w_d$  est calculée à partir de l'équation suivante :

$$w_d(u) = \frac{(I_0(u) - I_2(u)) + (I_3(u) - I_1(u))}{w_r} \quad (C.2)$$

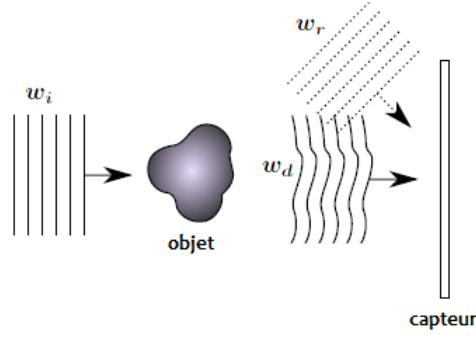


FIGURE C.1 – Technique d'holographie : interférence de l'onde diffractée avec l'onde de référence.

### C.1.2 Reconstruction numérique de l'objet

L'idée de la tomographie diffractive est de construire numériquement la distribution d'IRs dans le spécimen à partir de l'onde diffractée par l'objet. Ceci est possible par la résolution du système d'équations de Helmholtz (C.3) que vérifient respectivement l'onde incidente  $w_i$  et l'onde  $w$  résultant de l'interférence de l'onde incidente et de l'onde diffractée ( $w = w_i + w_d$ ) [Simon 2007] :

$$\begin{cases} \nabla^2 w(u) + k_0^2 n_s^2(u) w(u) = 0 \\ \nabla^2 w_i(u) + k_0^2 n_{is}^2(u) w_i(u) = 0 \end{cases} \quad (C.3)$$

$k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$  représente le nombre d'onde dans le vide ( $\lambda$  étant la longueur d'onde de la lumière dans le vide).  $n_s(u)$  est une fonction à valeurs complexes : sa partie réelle représente la distribution d'IRs dans l'objet et sa partie imaginaire représente le facteur d'absorption dans l'objet.  $n_{is}$  est aussi un nombre complexe dont les parties réelle et imaginaire correspondent respectivement à l'IR et au facteur d'absorption du milieu dans lequel l'objet est immergé.

Le système (C.3) est équivalent à l'équation suivante :

$$\nabla^2 w_d(u) + k^2 w_d(u) = - \underbrace{k_0^2 (n_s^2(u) - n_{is}^2(u))}_{s(u)} w(u) \quad (C.4)$$

L'image enregistrée par la tomographie diffractive est la solution de l'équation ci-dessus et elle représente la fonction donnée par l'équation suivante :

$$s(u) = k_0^2 (n_s^2(u) - n_{is}^2(u)) \quad (C.5)$$



Étant donné que la valeur de  $n_{is}$  est inconnu, la mesure enregistrée par la tomographie diffractive ne donne qu'une indication sur les valeurs d'IR et de facteur d'absorption dans l'objet. Les valeurs d'intensité de la partie réelle de l'image TDM ne sont que des valeurs relatives de la distribution d'IR dans le spécimen et ne peuvent être utilisées directement pour le calcul de la PSF théorique. La valeur absolue de l'IR reste inconnues et son estimation est encore un problème ouvert.

La reconstruction numérique de l'objet par la tomographie diffractive se fait par la résolution de l'équation (C.4) dans le domaine de Fourier. Le support de l'objet dans Fourier définit la bande passante du système et par la suite son pouvoir de résolution. En effet, plus le support fréquentiel de l'objet est étendu, plus la résolution de l'image est meilleure. Les fréquences de l'objet sont données par le vecteur de l'onde objet  $\mathbf{k}_s$ . Celui-ci est lié aux vecteurs de l'onde incidente  $\mathbf{k}_i$  et de l'onde diffractée  $\mathbf{k}_d$  par la relation suivante [Simon 2007] :

$$\mathbf{k}_s = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (\text{C.6})$$

Cette relation implique que les composantes du vecteur d'onde objet décrivent la même forme que celle décrite par les composantes du vecteur d'onde de diffraction, pour une incidence donnée. Par ailleurs, les vecteurs d'ondes  $\mathbf{k}_d$  et  $\mathbf{k}_i$  vérifient la condition suivante, dite condition d'élasticité [Simon 2007] :

$$|\mathbf{k}_d| = |\mathbf{k}_i| \quad (\text{C.7})$$

D'après cette relation, le vecteur  $\mathbf{k}_d$  décrit une sphère de rayon  $|\mathbf{k}_i|$ , appelée *sphère d'Ewald* (voir figure C.2 (a)). Suivant la position du plan de projection, il est possible d'enregistrer soit la partie transmise, soit la partie réfléchie de l'onde diffractée. Par conséquent, le vecteur de l'onde diffractée ne décrit pas une sphère complète mais à une demi-sphère dont les dimensions sont limitées par l'ouverture numérique de l'objectif du système optique (voir figure C.2 (b) et (c)). Les composantes du vecteur de l'onde diffractée se trouvent sur une calotte de sphère donnée par l'ouverture numérique du système.

L'équation (C.6) implique que le vecteur objet  $\mathbf{k}_s$  décrit aussi une calotte de sphère, obtenue par une translation de  $-\mathbf{k}_i$  de la calotte de sphère décrite par le vecteur de diffraction. Le support des fréquences objet est alors une calotte de sphère de rayon  $|\mathbf{k}_d|$ . Dans le but d'améliorer la résolution du système, une technique de balayage angulaire de l'illumination est utilisée afin d'élargir le support fréquentiel de l'objet. Pour chaque direction du vecteur d'illumination  $\mathbf{k}_i$ , la calotte de sphère supportant les fréquences de l'objet aura une nouvelle position, comme illustré dans la figure C.3. La collection de ces calottes de sphères pour une variation de l'angle d'incidence entre  $-\frac{\pi}{2}$  et  $+\frac{\pi}{2}$  forme un tore plein (une coupe axiale de cette forme est présentée dans la figure C.3 (droite)). Avec cette technique, uniquement les fréquences radiales sont bien élargies, les fréquences axiales restent limitées (on obtient ce que l'on appelle le *cône manquant*). Nous discutons ceci dans le paragraphe C.2 où nous comparons les résolutions des microscopes de fluorescence confocal et de tomographie diffractive.

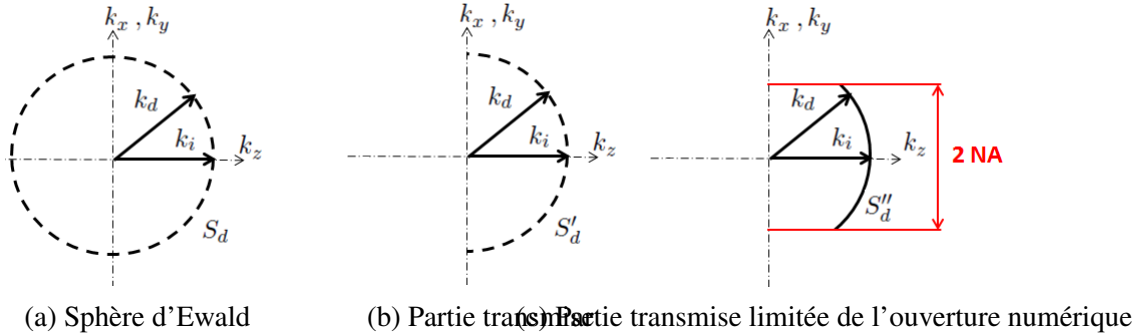


FIGURE C.2 – Le vecteur de l'onde diffractée décrit une calotte de sphère dans la taille est limitée par l'ouverture numérique du système optique.

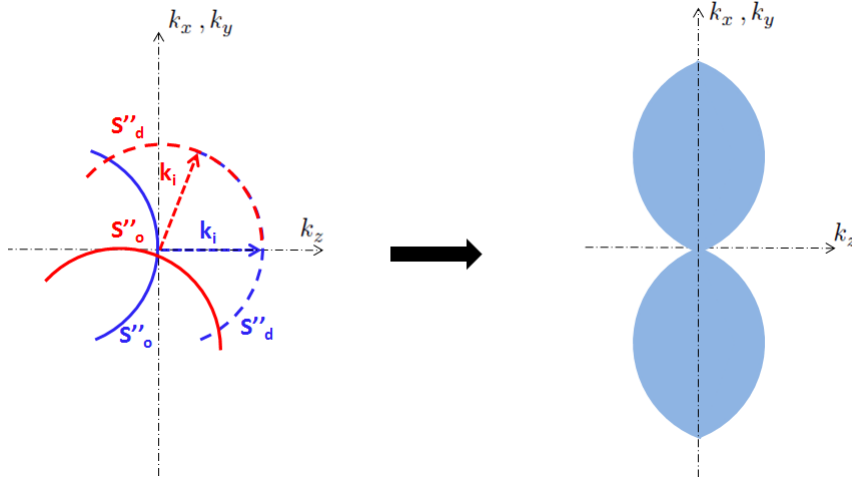


FIGURE C.3 – La variation de l'angle d'illumination entre  $-\frac{\pi}{2}$  et  $+\frac{\pi}{2}$  permet l'enregistrement d'un ensemble de calottes de sphères dans Fourier (gauche), celles-ci remplissent le volume d'un tore qui correspond au support fréquentiel de l'objet. Une coupe axiale de la forme obtenue est présentée à droite.

## C.2 Limites de l'imagerie TDM

Une des principales limites de l'imagerie TDM est la résolution axiale qui est limitée par le cône manquant. Les résolutions radiale  $R_{XY}^{TDM}$  et axiale  $R_Z^{TDM}$  peuvent être déterminées à partir de la mesure de dimension du support fréquentiel de l'objet. Celles-ci s'expriment comme suit [Simon 2007] :

$$\begin{cases} R_{XY}^{TDM} = \frac{\lambda}{4NA} \\ R_Z^{TDM} = \frac{\lambda}{2 \left( 1 - \sqrt{1 - \left( \frac{NA}{n_i} \right)^2} \right)} \end{cases} \quad (C.8)$$

La résolution radiale du microscope TDM est environ deux fois meilleure que celle du microscope CLSM, tandis que la résolution axiale du microscope TDM est beaucoup moins bonne que celle du microscope CLSM.

La figure C.4 présente des coupes radiales et axiales d'un couple d'images CLSM/TDM d'un grain de pollen de perce-neige. Pour ces acquisitions, le laser utilisé est le Hélium-Néon (de longueur d'onde d'environ  $633\text{ nm}$ ). L'objectif 100X, commun aux deux systèmes d'imagerie CLSM/TDM, a une ouverture numérique de 1,4, le milieu d'immersion étant l'huile. Les pas d'échantillonnage radial et axial sont respectivement  $93\text{ nm}$  et  $93\text{ nm}$  pour l'acquisition en fluorescence et  $50\text{ nm}$  et  $50\text{ nm}$  pour l'acquisition en tomographie diffractive. Ces figures montrent la perte d'information axiale dans les images TDM à cause de la faible résolution en  $Z$ . En effet, seules les contours verticaux sont récupérés, les contours horizontaux sont perdus à cause du cône manquant caractéristique de l'imagerie TDM. En revanche, dans les images CLSM, les contours horizontaux sont bien restitués tandis que les contours verticaux sont moins restitués que dans les images TDM. La figure C.5 présentant le module de la transformée de Fourier des données TDM, illustre encore ces constatations.

L'amélioration de la résolution axiale en imagerie TDM est possible par l'une des deux méthodes suivantes :

- l'élargissement du support fréquentiel de l'objet en effectuant l'enregistrement à la fois en transmission et en réflexion [Simon 2007]. Cette technique est déjà mise en place à l'institut de Fresnel.
- la rotation de  $\frac{\pi}{2}$  de l'objet de façon à inverser les axes ( $OX$ ) et ( $OZ$ ) i.e. l'axe optique ne correspond plus à ( $OZ$ ) mais à ( $OX$ ). L'information en  $Z$  sera alors mieux restituée.

Nous considérons dans ce travail que l'une de ces méthodes est appliquée afin d'obtenir une meilleure résolution axiale. Nous verrons dans la section suivante comment nous exploitons cela pour améliorer la restauration de l'image de microscopie de fluorescence confocale.

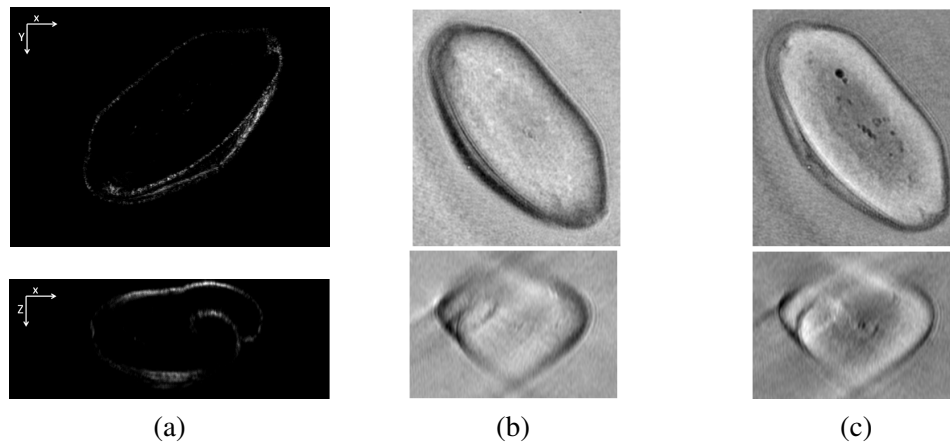


FIGURE C.4 – Coupes radiales (première ligne), et axiales (deuxième ligne) des images CLSM et TDM d'un grain de pollen : (a) montre l'image de microscopie de fluorescence confocale, (b) et (c) montrent respectivement les parties réelle et imaginaire de tomographie diffractive. Les axes ( $OX$ ) et ( $OY$ ) sont inversés dans les images CLSM et TDM.

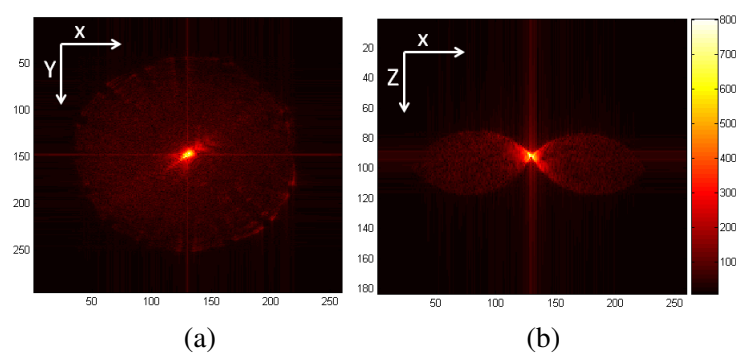


FIGURE C.5 – Coupes radiale (a) et axiale (b) du module de la transformée de Fourier de l'image de grain de pollen (à valeurs complexe) obtenue par la tomographie diffractive .

# Bibliographie

- [Aghdasi 1996] F. Aghdasi et R.K. Ward. *Reduction of boundary artifacts in image restoration*. IEEE Transactions on Image Processing, vol. 5, no. 4, pages 611–618, 1996. (Cité en page 58.)
- [Arigovindan 2010] M. Arigovindan, J. Shaevitz, J. McGowan, J.W. Sedat et D.A. Agard. *A parallel product-convolution approach for representing the depth varying point spread functions in 3D widefield microscopy based on principal component analysis*. Optics express, vol. 18, no. 7, pages 6461–6476, 2010. (Cité en page 63.)
- [Aubailly 2007] M. Aubailly, M.C. Roggemann et T.J. Schulz. *Approach for reconstructing anisoplanatic adaptive optics images*. Applied optics, vol. 46, no. 24, pages 6055–6063, 2007. (Cité en page 54.)
- [Aubert 2006] G. Aubert et P. Kornprobst. *Mathematical problems in image processing : partial differential equations and the calculus of variations*, volume 147. Springer-Verlag New York, 2006. (Cité en pages 96 et 97.)
- [Ayers 1988] G. R. Ayers et J. C. Dainty. *Iterative blind deconvolution method and its applications*. Optics Letters, vol. 13, no. 7, pages 547–549, 1988. (Cité en page 91.)
- [Bar 2006] L. Bar, N. Sochen et N. Kiryati. *Semi-blind image restoration via Mumford-Shah regularization*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 15, no. 2, pages 483–493, 2006. (Cité en page 91.)
- [Bar 2007] L. Bar, N. Sochen et N. Kiryati. *Restoration of images with piecewise space-variant blur*. Scale Space and Variational Methods in Computer Vision, pages 533–544, 2007. (Cité en page 94.)
- [Bardsley 2004] J.M. Bardsley et C.R. Vogel. *A nonnegatively constrained convex programming method for image reconstruction*. SIAM Journal on Scientific Computing, vol. 25, no. 4, pages 1326–1343, 2004. (Cité en page 48.)
- [Bardsley 2006a] J. Bardsley, S. Jefferies, J. Nagy et R. Plemmons. *Blind Iterative Restoration of Images with Spatially-Varying Blur*. Optics Express, vol. 14, no. 5, pages 1767–1782, 2006. (Cité en page 93.)
- [Bardsley 2006b] J. Bardsley, S. Jefferies, J. Nagy et R. Plemmons. *A computational method for the restoration of images with an unknown, spatially-varying blur*. Optics Express, vol. 14, no. 5, pages 1767–1782, 2006. (Cité en page 55.)
- [Bardsley 2009] J.M. Bardsley et J. Goldes. *Regularization parameter selection methods for ill-posed Poisson maximum likelihood estimation*. Inverse Problems, vol. 25, no. 9, page 095005, 2009. (Cité en pages 52 et 140.)
- [Barzilai 1988] J. Barzilai et J.M. Borwein. *Two-point step size gradient methods*. IMA Journal of Numerical Analysis, vol. 8, no. 1, pages 141–148, 1988. (Cité en page 68.)

- [Bect 2004] J. Bect, L. Blanc-Féraud, G. Aubert et A. Chambolle. *A  $L1$ -unified variational framework for image restoration*. volume 3024, pages 1–13, Prague, Czech Republic, 2004. (Cité en page 49.)
- [Bertero 1998a] M. Bertero et P. Boccacci. *Introduction to Inverse Problems in Imaging*. 1998. (Cité en page 47.)
- [Bertero 1998b] M. Bertero et P. Boccacci. *Introduction to inverse problems in imaging*. Taylor & Francis, 1998. (Cité en page 88.)
- [Bertero 1999] M. Bertero, C. De Mol et ER Pike. *Linear inverse problems with discrete data : II. Stability and regularisation*. *Inverse Problems*, vol. 4, no. 3, page 573, 1999. (Cité en page 48.)
- [Biemond 1990] J. Biemond, R.L. Lagendijk et R.M. Mersereau. *Iterative methods for image deblurring*. *Proceedings of the IEEE*, vol. 78, no. 5, pages 856–883, 1990. (Cité en page 45.)
- [Blanco 2011] L. Blanco et LM Mugnier. *Marginal blind deconvolution of adaptive optics retinal images*. *Optics Express*, vol. 19, no. 23, pages 23227–23239, 2011. (Cité en page 90.)
- [Blume 2007] Moritz Blume, Darko Zikic, Wolfgang Wein et Nassir Navab. *A New and General Method for Blind Shift-Variant Deconvolution of Biomedical Images*. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, vol. 4791, pages 743–750, 2007. (Cité en page 94.)
- [Boden 1996] AF Boden, DC Redding, RJ Hanisch et J. Mo. *Massively parallel spatially variant maximum-likelihood restoration of Hubble Space Telescope imagery*. *JOSA A*, vol. 13, no. 7, pages 1537–1545, 1996. (Cité en page 54.)
- [Bolte 2010] J. Bolte, PL Combettes et JC Pesquet. *Alternating proximal algorithm for blind image recovery*. In *IEEE International Conference on Image Processing*, Hong-Kong, 2010. (Cité en page 95.)
- [Bonettini 2009] S. Bonettini, R. Zanella et L. Zanni. *A scaled gradient projection method for constrained image deblurring*. *Inverse Problems*, vol. 25, page 015002, 2009. (Cité en pages 48, 50, 67, 68, 69, 71, 86, 105, 107 et 137.)
- [Bonnans 2006] J.F. Bonnans, J.C. Gilbert, C. Lemaréchal et C.A. Sagastizábal. *Numerical optimization : theoretical and practical aspects*. Springer, 2006. (Cité en pages 46 et 47.)
- [Booth 1998] M.J. Booth, MAA Neil et T. Wilson. *Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media*. *Journal of Microscopy*, vol. 192, no. 2, pages 90–98, 1998. (Cité en pages 23 et 26.)
- [Booth 2007] M.J. Booth. *Adaptive optics in microscopy*. *Philosophical Transactions of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 365, no. 1861, pages 2829–2843, 2007. (Cité en page 38.)
- [Born 1959] M. Born et E. Wolf. *Principles of optics*. Pergamon, New York, 1959. (Cité en pages 23 et 26.)

- [Born 1999] M. Born et E. Wolf. Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. Cambridge university press, 1999. (Cité en page 24.)
- [Born 2003] M. Born et E. Wolf. Principles of optics. Cambridge Univ Press, 2003. (Cité en page 23.)
- [Boyd 2004] S. Boyd et L. Vandenberghe. Convex optimization. Cambridge university press, 2004. (Cité en pages 46 et 67.)
- [Campisi 2007] P. Campisi et K. Egiazarian. Blind image deconvolution : theory and applications. CRC, 2007. (Cité en pages 89 et 92.)
- [Cannon 1976] M. Cannon. *Blind deconvolution of spatially invariant image blurs with phase*. Acoustics, Speech and Signal Processing, IEEE Transactions on, vol. 24, no. 1, pages 58–63, 1976. (Cité en page 90.)
- [Carlavan 2011] M. Carlavan et L. Blanc-Féraud. *Sparse Poisson Noisy Image Deblurring*. Image Processing, IEEE Transactions on, no. 99, pages 1–1, 2011. (Cité en pages 48 et 51.)
- [Chambolle 2004] A. Chambolle. *An algorithm for total variation minimization and applications*. Journal of Mathematical Imaging and Vision, vol. 20, no. 1, pages 89–97, 2004. (Cité en page 78.)
- [Chambolle 2011] A. Chambolle et T. Pock. *A first-order primal-dual algorithm for convex problems with applications to imaging*. Journal of Mathematical Imaging and Vision, vol. 40, no. 1, pages 120–145, 2011. (Cité en pages 54 et 76.)
- [Chan 2000] T.F. Chan et C.K. Wong. *Convergence of the alternating minimization algorithm for blind deconvolution*. Linear Algebra and its Applications, vol. 316, no. 1, pages 259–285, 2000. (Cité en page 92.)
- [Chaux 2007] C. Chaux, L. Blanc-Féraud et J. Zerubia. *Wavelet-based restoration methods : application to 3D confocal microscopy images*. In Proc. SPIE Conference on Wavelets, 2007. (Cité en page 49.)
- [Chaux 2012] C. Chaux, L. Blanc-Féraud et al. *Wavelet-based hyperparameter estimation for solving inverse problems*. 2012. (Cité en pages 53 et 140.)
- [Cho 2009] S. Cho et S. Lee. *Fast motion deblurring*. In ACM Transactions on Graphics (TOG), volume 28, page 145. ACM, 2009. (Cité en pages 94 et 105.)
- [Cole 2011] R.W. Cole, T. Jinadasa et C.M. Brown. *Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control*. Nature Protocols, vol. 6, no. 12, pages 1929–1941, 2011. (Cité en page 22.)
- [Cresci 2005] G. Cresci, RI Davies, AJ Baker et MD Lehnert. *Accounting for the anisoplanatic point spread function in deep wide-field adaptive optics images*. Astronomy and Astrophysics, vol. 438, no. 2, pages 757–767, 2005. (Cité en page 54.)
- [Dai 2006] Y.H. Dai et R. Fletcher. *New algorithms for singly linearly constrained quadratic programs subject to lower and upper bounds*. Mathematical Programming, vol. 106, no. 3, pages 403–421, 2006. (Cité en page 48.)



- [Daubechies 2004] I. Daubechies, M. Defrise et C. De Mol. *An iterative thresholding algorithm for linear inverse problems with a sparsity constraint*. Communications on pure and applied mathematics, vol. 57, no. 11, pages 1413–1457, 2004. (Cité en page 49.)
- [De Meyer 2008] A. De Meyer. *Contribution à l'amélioration des outils de restauration d'images et de caractérisation de l'instrument en microscopie 3D par fluorescence*. PhD thesis, Université de Haute Alsace, 7 2008. (Cité en pages 11 et 12.)
- [De Mol 1992] C. De Mol. *A critical survey of regularized inversion methods*. Inverse Problems in Scattering and Imaging, pages 345–369, 1992. (Cité en page 48.)
- [Dempster 1977] A.P. Dempster, N.M. Laird et D.B. Rubin. *Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm*. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), pages 1–38, 1977. (Cité en pages 47, 53 et 66.)
- [Denis 2011] L. Denis, E. Thiébaud et F. Soulez. *Fast model of space-variant blurring and its application to deconvolution in astronomy*. In IEEE International Conference on Image Processing (ICIP), Brussels, Belgium, Septembre 2011. (Cité en page 63.)
- [Desbat 1995] L. Desbat et D. Girard. *The minimum reconstruction error choice of regularization parameters : Some more efficient methods and their application to deconvolution problems*. SIAM Journal on Scientific Computing, vol. 16, no. 6, pages 1387–1403, 1995. (Cité en page 52.)
- [Dey 2006] N. Dey, L. Blanc-Féraud, C. Zimmer, Z. Kam, P. Roux, J.C. Olivo-Marin et J. Zerubia. *Richardson-Lucy Algorithm with Total Variation Regularization for 3D Confocal Microscope Deconvolution*. Microscopy Research Technique, vol. 69, no. 4, pages 260–266, 2006. (Cité en pages 2, 49, 50, 71, 73, 75 et 105.)
- [Dupé 2009] F.X. Dupé, J.M. Fadili et J.L. Starck. *A proximal iteration for deconvolving Poisson noisy images using sparse representations*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 18, no. 2, pages 310–321, 2009. (Cité en page 49.)
- [Egner 2006] A. Egner et S.W. Hell. *Aberrations in confocal and multi-photon fluorescence microscopy induced by refractive index mismatch*. Handbook of Biological Confocal Microscopy, pages 404–413, 2006. (Cité en pages 23, 24, 26 et 136.)
- [Engl 1996] H.W. Engl, M. Hanke et A. Neubauer. *Regularization of inverse problems*, volume 375. Springer, 1996. (Cité en page 52.)
- [Escande 2012] Paul Escande, Pierre Weiss, François Malgouyres et al. *SPATIALLY VARYING BLUR RECOVERY. Diagonal Approximations in the Wavelet Domain*. 2012. (Cité en page 54.)
- [Fienup 1982] J.R. Fienup. *Phase retrieval algorithms : a comparison*. Applied Optics, vol. 21, no. 15, pages 2758–2769, 1982. (Cité en page 136.)
- [Figueiredo 2003] M.A.T. Figueiredo et R.D. Nowak. *An EM algorithm for wavelet-based image restoration*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 12, no. 8, pages 906–916, 2003. (Cité en page 53.)
- [Fornasier 2009a] M. Fornasier, A. Langer et C.B. Schönlieb. *A convergent overlapping domain decomposition method for total variation minimization*. Numerische Mathematik, pages 1–41, 2009. (Cité en pages 76, 77, 78, 79, 81, 86, 135 et 140.)



- [Fornasier 2009b] M. Fornasier et C.B. Schönlieb. *Subspace Correction Methods for Total Variation and L1 Minimization*. SIAM Journal on Numerical Analysis, vol. 47, page 3397, 2009. (Cité en page 76.)
- [Frassoldati 2008] G. Frassoldati, L. Zanni et G. Zanghirati. *New adaptive stepsize selections in gradient methods*. Journal of industrial and management optimization, vol. 4, no. 2, page 299, 2008. (Cité en page 68.)
- [Friskén Gibson 1991] S. Friskén Gibson et F. Lanni. *Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy*. JOSA A, vol. 8, no. 10, pages 1601–1613, 1991. (Cité en pages 23 et 26.)
- [Fujimoto 2009] J.G. Fujimoto et D. Farkas. Biomedical optical imaging. Oxford University Press, USA, 2009. (Cité en page 6.)
- [Galatsanos 1992] N.P. Galatsanos et A.K. Katsaggelos. *Methods for choosing the regularization parameter and estimating the noise variance in image restoration and their relation*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 1, no. 3, pages 322–336, 1992. (Cité en page 52.)
- [Geman 1984] S. Geman et D. Geman. *Stochastic relaxation, Gibbs distributions, and the Bayesian restoration of images*. Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on, no. 6, pages 721–741, 1984. (Cité en page 52.)
- [Geman 1993] S. Geman, K.M. Manbeck et D.E. McClure. *A comprehensive statistical model for single-photon emission tomography*, 1993. (Cité en page 50.)
- [Gibson 1989] S.F. Gibson et F. Lanni. *Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy*. JOSA A, vol. 6, no. 9, pages 1357–1367, 1989. (Cité en pages 23, 26 et 27.)
- [Gilad 2006] E. Gilad et J. von Hardenberg. *A fast algorithm for convolution integrals with space and time variant kernels*. Journal of Computational Physics, vol. 216, no. 1, pages 326–336, 2006. (Cité en page 55.)
- [Green 1995] P.J. Green. *Reversible jump Markov chain Monte Carlo computation and Bayesian model determination*. Biometrika, vol. 82, no. 4, pages 711–732, 1995. (Cité en pages 52 et 93.)
- [Griffa 2010a] A. Griffa, N. Garin et D. Sage. *Comparison of Deconvolution Software in 3D Microscopy : A User Point of View—Part 1*. G.I.T. Imaging & Microscopy, vol. 12, no. mar, pages 43–45, 3 2010. (Cité en page 43.)
- [Griffa 2010b] A. Griffa, N. Garin et D. Sage. *Comparison of Deconvolution Software in 3D Microscopy : A User Point of View—Part 2*. G.I.T. Imaging & Microscopy, vol. 12, no. 3, pages 41–43, aug 2010. (Cité en page 43.)
- [Guo 1996] YP Guo, HP Lee et CL Teo. *Blind restoration of images degraded by space-variant blurs using iterative algorithms for both blur identification and image restoration*. Image and vision computing, vol. 15, no. 5, pages 399–410, 1996. (Cité en page 93.)

- [Haeberle 2004] O. Haeberle et B. Simon. *The point spread function of fluorescence microscopes imaging through a layered or an inhomogeneous medium*. In Proceedings of SPIE, volume 5462, page 11, 2004. (Cité en page 22.)
- [Haeberlé 2010] O. Haeberlé, K. Belkebir, H. Giovaninni et A. Sentenac. *Tomographic diffractive microscopy : basics, techniques and perspectives*. Journal of Modern Optics, vol. 57, no. 9, pages 686–699, 2010. (Cité en page 151.)
- [Hajlaoui 2010] N. Hajlaoui, C. Chaux, G. Perrin, F. Falzon et A. Benazza-Benyahia. *Satellite image restoration in the context of a spatially varying point spread function*. JOSA A, vol. 27, no. 6, pages 1473–1481, 2010. (Cité en page 54.)
- [Hansen 1992] P.C. Hansen. *Analysis of discrete ill-posed problems by means of the L-curve*. SIAM review, vol. 34, no. 4, pages 561–580, 1992. (Cité en page 52.)
- [Hanser 2003] B.M. Hanser, M.G.L. Gustafsson, D.A. Agard et J.W. Sedat. *Phase retrieval for high-numerical-aperture optical systems*. Optics letters, vol. 28, no. 10, pages 801–803, 2003. (Cité en pages 136, 137 et 138.)
- [Harmeling 2010] S. Harmeling, M. Hirsch et B. Schölkopf. *Space-Variant Single-Image Blind Deconvolution for Removing Camera Shake*. Advances in Neural Information Processing Systems (NIPS), 2010. (Cité en page 94.)
- [Herberich 2012a] Gerlind Herberich, Reinhard Windoffer, RudolfE. Leube et Til Aach. *Signal and Noise Modeling in Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. In Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI), volume 7510, pages 381–388. Springer Berlin Heidelberg, 2012. (Cité en page 21.)
- [Herberich 2012b] Gerlind Herberich, Reinhard Windoffer, RudolfE. Leube et Til Aach. *Signal and Noise Modeling in Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. In Nicholas Ayache, Hervé Delingette, Polina Golland et Kensaku Mori, éditeurs, Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 2012, volume 7510 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 381–388. Springer Berlin Heidelberg, 2012. (Cité en page 128.)
- [Hirsch 2010] M. Hirsch, S. Sra, B. Scholkopf et S. Harmeling. *Efficient filter flow for space-variant multiframe blind deconvolution*. In IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), pages 607–614, 2010. (Cité en pages 2, 55, 66 et 94.)
- [Hiware 2011] S. Hiware, P. Porwal, R. Velmurugan et S. Chaudhuri. *Modeling the PSF for refractive index variation in fluorescence microscopy*. In IEEE International Conference on Image Processing (ICIP), Brussels, Belguim, 2011. (Cité en page 23.)
- [Hopkins 1955] H.H. Hopkins. *The frequency response of a defocused optical system*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, vol. 231, no. 1184, pages 91–103, 1955. (Cité en page 23.)
- [Ichir 2006] M.M. Ichir et A. Mohammad-Djafari. *Hidden Markov models for wavelet-based blind source separation*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 15, no. 7, pages 1887–1899, 2006. (Cité en pages 52 et 53.)

- [Inoué 2006] S. Inoué. *Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy*. Handbook of biological confocal microscopy, pages 1–19, 2006. (Cité en page 8.)
- [Jacobsen 2011] H. Jacobsen, P. Hänninen, E. Soini et SW Hell. *Refractive-index-induced aberrations in two-photon confocal fluorescence microscopy*. Journal of Microscopy, vol. 176, no. 3, pages 226–230, 2011. (Cité en page 26.)
- [Jacquelin 2003] E. Jacquelin, A. Bennani et P. Hamelin. *Force reconstruction : analysis and regularization of a deconvolution problem*. Journal of Sound and Vibration, vol. 265, no. 1, pages 81–107, 2003. (Cité en page 49.)
- [Jain 1989] A.K. Jain. Fundamentals of digital image processing, volume 569. Prentice hall Englewood Cliffs, NJ :, 1989. (Cité en page 44.)
- [Jalobeanu 2001] A. Jalobeanu. *Modèles, estimation bayésienne et algorithmes pour la déconvolution d’images satellitaires et aériennes*. PhD thesis, Université de Nice-Sophia Antipolis, 2001. (Cité en page 50.)
- [Jalobeanu 2002] A. Jalobeanu, L. Blanc-Féraud et J. Zerubia. *Hyperparameter estimation for satellite image restoration using a MCMC maximum-likelihood method*. Pattern Recognition, vol. 35, no. 2, pages 341–352, 2002. (Cité en page 53.)
- [Jezierska 2011] A. Jezierska, C. Chaux, J.-C. Pesquet et H. Talbot. *An EM approach for Poisson-Gaussian noise modeling*. In European Signal Processing Conference (EUSIPCO), pages 2244–2248, Barcelona, Aug. 2011. (Cité en page 21.)
- [KAM 2000] Z. KAM. *Computerized adaptive imaging*. WO Patent, June 2000. (Cité en page 23.)
- [Kam 2001] Z. Kam, B. Hanser, MGL Gustafsson, DA Agard et JW Sedat. *Computational adaptive optics for live three-dimensional biological imaging*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 98, no. 7, pages 3790–3795, 2001. (Cité en page 23.)
- [Katsaggelos 1991] A.K. Katsaggelos, MR Schroeder, T. Kohonen et TS Huang. Digital image restoration. Springer-Verlag New York, Inc., 1991. (Cité en page 88.)
- [Kenig 2010] T. Kenig, Z. Kam et A. Feuer. *Blind image deconvolution using machine learning for three-dimensional microscopy*. Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on, vol. 32, no. 12, pages 2191–2204, 2010. (Cité en page 89.)
- [König 2001] K. König. *Multiphoton microscopy in life sciences*. Journal of Microscopy, vol. 200, no. 2, pages 83–104, 2001. (Cité en page 1.)
- [Krawczyk-StańDo 2007] D. Krawczyk-StańDo et M. Rudnicki. *Regularization parameter selection in discrete ill-posed problems-the use of the U-curve*. International Journal of Applied Mathematics and Computer Science, vol. 17, no. 2, pages 157–164, 2007. (Cité en page 52.)
- [Krishnan 2009] D. Krishnan et R. Fergus. *Fast image deconvolution using hyper-laplacian priors*. Advances in Neural Information Processing Systems, vol. 22, pages 1–9, 2009. (Cité en page 94.)

- [Kundur 1998] D. Kundur et D. Hatzinakos. *A novel blind deconvolution scheme for image restoration using recursive filtering*. Signal Processing, IEEE Transactions on, vol. 46, no. 2, pages 375–390, 1998. (Cité en page 91.)
- [Lakowicz 2006] J.R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy, volume 1. Springer, 2006. (Cité en page 6.)
- [Lam 1999] E.Y. Lam et J.W. Goodman. *Iterative blind image deconvolution in space and frequency domains*. In Proc. SPIE, volume 3650, pages 70–77, 1999. (Cité en page 91.)
- [LAndwEbER 1951] L. LAndwEbER. *An iteration formula for Fredholm integral equations of the first kind*. Amer. J. Math, vol. 73, no. 3, pages 615–624, 1951. (Cité en pages 46, 50 et 82.)
- [Lane 1987] RG Lane et RHT Bates. *Automatic multidimensional deconvolution*. JOSA A, vol. 4, no. 1, pages 180–188, 1987. (Cité en page 90.)
- [Lantéri 2002] H. Lantéri, M. Roche et C. Aime. *Penalized maximum likelihood image restoration with positivity constraints : multiplicative algorithms*. Inverse problems, vol. 18, no. 5, pages 1397–1419, 2002. (Cité en pages 51 et 76.)
- [Le 2007] T. Le, R. Chartrand et T.J. Asaki. *A variational approach to reconstructing images corrupted by Poisson noise*. Journal of Mathematical Imaging and Vision, vol. 27, no. 3, pages 257–263, 2007. (Cité en page 52.)
- [Levin 2009] A. Levin, Y. Weiss, F. Durand et W.T. Freeman. *Understanding and evaluating blind deconvolution algorithms*. In IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), pages 1964–1971. IEEE, 2009. (Cité en page 89.)
- [Levin 2011] A. Levin, Y. Weiss, F. Durand et W.T. Freeman. *Efficient marginal likelihood optimization in blind deconvolution*. In Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), 2011 IEEE Conference on, pages 2657–2664. IEEE, 2011. (Cité en page 90.)
- [Lucy 1974] LB Lucy. *An iterative technique for the rectification of observed distributions*. The astronomical journal, vol. 79, page 745, 1974. (Cité en page 47.)
- [Luisier 2011] F. Luisier, T. Blu et M. Unser. *Image Denoising in Mixed Poisson–Gaussian Noise*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 20, no. 3, pages 696–708, 2011. (Cité en page 21.)
- [Maalouf 2010] E. Maalouf. *Contribution to fluorescence microscopy, 3D thick samples deconvolution and depth-variant PSF*. PhD thesis, Mulhouse, France, 2010. (Cité en pages 3, 54, 62, 64 et 84.)
- [Metropolis 1953] N. Metropolis, A.W. Rosenbluth, M.N. Rosenbluth, A.H. Teller et E. Teller. *Equation of state calculations by fast computing machines*. The journal of chemical physics, vol. 21, page 1087, 1953. (Cité en pages 52 et 93.)
- [Minsky 1988] M. Minsky. *Memoir on inventing the confocal microscope*. Scanning, vol. 10, pages 128–138, 1988. (Cité en page 1.)
- [More 1978] J. More. *The Levenberg-Marquardt algorithm : implementation and theory*. Numerical analysis, pages 105–116, 1978. (Cité en page 47.)

- [Mugnier 2004] L.M. Mugnier, T. Fusco et J.M. Conan. *MISTRAL : a myopic edge-preserving image restoration method, with application to astronomical adaptive-optics-corrected long-exposure images*. JOSA A, vol. 21, no. 10, pages 1841–1854, 2004. (Cité en page 91.)
- [Nagy 1996] J.G. Nagy, R.J. Plemmons et T.C. Torgersen. *Iterative image restoration using approximate inverse preconditioning*. IEEE Transactions on Image Processing, vol. 5, no. 7, pages 1151–1162, 1996. (Cité en pages 54 et 66.)
- [Nagy 1998] J.G. Nagy et D.P. O’Leary. *Restoring images degraded by spatially variant blur*. SIAM Journal on Scientific Computing, vol. 19, no. 4, pages 1063–1082, 1998. (Cité en pages 55 et 94.)
- [Ng 2010] M. Ng, P. Weiss et X.M. Yuan. *Solving constrained total-variation image restoration and reconstruction problems via alternating direction methods*. SIAM journal on Scientific Computing, vol. 32, pages 2710–2736, 2010. (Cité en page 48.)
- [Nocedal 1999] J. Nocedal et S.J. Wright. Numerical optimization. Springer verlag, 1999. (Cité en page 46.)
- [Orieux 2009] F. Orieux. *inversion bayésienne myope et non-supervisée pour l’imagerie sur-résolue. Application à l’instrument SPIRE de l’observatoire spatial Herschel*. PhD thesis, Université Paris-Sud 11, faculté des sciences d’Orsay, Novembre 2009. (Cité en pages 52, 53, 93 et 140.)
- [Orieux 2010] François Orieux, Jean-François Giovannelli et Thomas Rodet. *Bayesian estimation of regularization and point spread function parameters for Wiener–Hunt deconvolution*. JOSA A, vol. 27, no. 7, pages 1593–1607, 2010. (Cité en page 93.)
- [Ozkan 1994] M.K. Ozkan, A.M. Tekalp et M.I. Sezan. *POCS-based restoration of space-varying blurred images*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 3, no. 4, pages 450–454, 1994. (Cité en page 54.)
- [Pankajakshan 2009a] P. Pankajakshan. *Blind Deconvolution for Confocal Laser Scanning Microscopy*. PhD thesis, Université de Nice Sophia Antipolis, December 2009. (Cité en pages 10, 13, 17, 23, 25, 27 et 29.)
- [Pankajakshan 2009b] P. Pankajakshan, B. Zhang, L. Blanc-Féraud, Z. Kam, J.C. Olivo-Marin et J. Zerubia. *Blind deconvolution for thin-layered confocal imaging*. Applied optics, vol. 48, no. 22, pages 4437–4448, 2009. (Cité en page 91.)
- [Paul 2010] P. Paul, H. Dueessmann, T. Bernas, H. Huber et D. Kalamatianos. *Automatic noise quantification for confocal fluorescence microscopy images*. Computerized Medical Imaging and Graphics, vol. 34, no. 6, pages 426–434, 2010. (Cité en page 21.)
- [Pawley 2006] J. Pawley. Handbook of biological confocal microscopy. Springer, 2006. (Cité en pages 1 et 8.)
- [Paxman 1992] R.G. Paxman, T.J. Schulz et J.R. Fienup. *Joint estimation of object and aberrations by using phase diversity*. JOSA A, vol. 9, no. 7, pages 1072–1085, 1992. (Cité en page 92.)



- [Pesquet 1996] J.C. Pesquet, H. Krim, D. Leporini et E. Hamman. *Bayesian approach to best basis selection*. In Acoustics, Speech, and Signal Processing, 1996. ICASSP-96. Conference Proceedings., 1996 IEEE International Conference on, volume 5, pages 2634–2637. IEEE, 1996. (Cité en page 53.)
- [Pesquet 2009] J.C. Pesquet, A. Benazza-Benyahia et C. Chaux. *A SURE approach for digital signal/image deconvolution problems*. Signal Processing, IEEE Transactions on, vol. 57, no. 12, pages 4616–4632, 2009. (Cité en page 52.)
- [Preza 2004] C. Preza et J.A. Conchello. *Depth-variant maximum-likelihood restoration for three-dimensional fluorescence microscopy*. JOURNAL-OPTICAL SOCIETY OF AMERICA A, vol. 21, no. 9, pages 1593–1601, 2004. (Cité en pages 54, 55, 61 et 66.)
- [Ramani 2008] S. Ramani, C. Vonesch et M. Unser. *Deconvolution of 3D fluorescence micrographs with automatic risk minimization*. In Biomedical Imaging : From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008. 5th IEEE International Symposium on, pages 732–735. IEEE, 2008. (Cité en page 52.)
- [Ramani 2012] S. Ramani, Z. Liu, J. Rosen, J. Nielsen et J.A. Fessler. *Regularization parameter selection for nonlinear iterative image restoration and mri reconstruction using GCV and SURE-based methods*. Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 21, no. 8, pages 3659–3672, 2012. (Cité en page 52.)
- [Řeřábek 2008] M. Řeřábek et P. Pata. *The space variant PSF for deconvolution of wide-field astronomical images*. In Proceedings of SPIE, volume 7015, page 70152G, 2008. (Cité en page 54.)
- [Richards 1959] B. Richards et E. Wolf. *Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, vol. 253, no. 1274, pages 358–379, 1959. (Cité en page 22.)
- [Richardson 1972] W.H. Richardson. *Bayesian-based iterative method of image restoration*. JOSA, vol. 62, no. 1, pages 55–59, 1972. (Cité en page 47.)
- [Rudin 1992] L.I. Rudin, S. Osher et E. Fatemi. *Nonlinear total variation based noise removal algorithms*. Physica D : Nonlinear Phenomena, vol. 60, no. 1-4, pages 259–268, 1992. (Cité en page 96.)
- [Rudin 1994] L.I. Rudin et S. Osher. *Total variation based image restoration with free local constraints*. In IEEE International Conference on Image Processing, volume 1, pages 31–35, Austin, TX, USA, 1994. (Cité en page 49.)
- [Schulz 1993] T.J. Schulz. *Multiframe blind deconvolution of astronomical images*. JOSA A, vol. 10, no. 5, pages 1064–1073, 1993. (Cité en page 91.)
- [Schulz 1997] T. Schulz, B. Stribling et J. Miller. *Multiframe blind deconvolution with real data : imagery of the Hubble Space Telescope*. Optics Express, vol. 1, no. 11, pages 355–362, 1997. (Cité en page 91.)
- [Sezan 1982] M.I. Sezan et H. Stark. *Image restoration by the method of convex projections : Part 2-Applications and numerical results*. Medical Imaging, IEEE Transactions on, vol. 1, no. 2, pages 95–101, 1982. (Cité en page 91.)

- [Shaevitz 2007] J.W. Shaevitz et D.A. Fletcher. *Enhanced three-dimensional deconvolution microscopy using a measured depth-varying point-spread function*. JOSA A, vol. 24, no. 9, pages 2622–2627, 2007. (Cité en page 54.)
- [Sharma 1982] A. Sharma, D.V. Kumar et A.K. Ghatak. *Tracing rays through graded-index media : a new method*. Applied Optics, vol. 21, no. 6, pages 984–987, 1982. (Cité en page 23.)
- [Sharma 2006] K.K. Sharma. Optics : principles and applications. Academic Press, 2006. (Cité en page 10.)
- [Shepp 1982] L.A. Shepp et Y. Vardi. *Maximum likelihood reconstruction for emission tomography*. IEEE Transactions on Medical Imaging, vol. 1, no. 2, pages 113–122, 1982. (Cité en pages 47 et 66.)
- [Simon 2007] B. Simon. *Application des techniques de déconvolution et de tomographie diffractive à l'amélioration de l'imagerie microscopique 2D et 3D*. PhD thesis, Université de Haute Alsace, Mulhouse, France, December 2007. (Cité en pages 151, 152, 153, 154 et 155.)
- [Stagliano 2011] A. Stagliano, P. Boccacci et M. Bertero. *Analysis of an approximate model for Poisson data reconstruction and a related discrepancy principle*. Inverse Problems, vol. 27, page 125003, 2011. (Cité en page 90.)
- [Stockham Jr 1975] T.G. Stockham Jr, T.M. Cannon et R.B. Ingebreetsen. *Blind deconvolution through digital signal processing*. Proceedings of the IEEE, vol. 63, no. 4, pages 678–692, 1975. (Cité en page 90.)
- [Stokseth 1969] P.A. Stokseth. *Properties of a defocused optical system*. JOSA, vol. 59, no. 10, pages 1314–1321, 1969. (Cité en pages 23, 24 et 26.)
- [Török 1995] P. Török, P. Varga, Z. Laczik et GR Booker. *Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices : an integral representation*. JOSA A, vol. 12, no. 2, pages 325–332, 1995. (Cité en page 22.)
- [Trussell 1978] H. Trussell et B. Hunt. *Image restoration of space variant blurs by sectioned methods*. In Acoustics, Speech, and Signal Processing, IEEE International Conference on ICASSP'78., volume 3, pages 196–198. IEEE, 1978. (Cité en page 54.)
- [Tsumuraya 1994] F. Tsumuraya, N. Miura et N. Baba. *Iterative blind deconvolution method using Lucy's algorithm*. Astronomy and Astrophysics, vol. 282, pages 699–708, 1994. (Cité en page 91.)
- [Unser 1993a] M. Unser, A. Aldroubi et M. Eden. *B-Spline Signal Processing : Part I—Theory*. IEEE Transactions on Signal Processing, vol. 41, no. 2, pages 821–833, February 1993. IEEE Signal Processing Society's 1995 best paper award. (Cité en page 63.)
- [Unser 1993b] M. Unser, A. Aldroubi et M. Eden. *B-Spline Signal Processing : Part II—Efficient Design and Applications*. IEEE Transactions on Signal Processing, vol. 41, no. 2, pages 834–848, February 1993. (Cité en page 63.)

- [Valeur 2012] B. Valeuret *al.* Molecular fluorescence : principles and applications. Wiley-Vch, 2012. (Cité en page 6.)
- [van Laarhoven 1987] P.J. van Laarhoven et E.H. Aarts. Simulated annealing : theory and applications, volume 37. Springer, 1987. (Cité en pages 33, 52 et 121.)
- [Vese 2001] L. Vese. *A Study in the BV Space of a Denoising-Deblurring Variational Problem.* Applied Mathematics & Optimization, vol. 44, no. 2, pages 131–161, 2001. (Cité en page 79.)
- [Vogel 2002] C.R. Vogel. Computational methods for inverse problems, volume 23. Society for Industrial Mathematics, 2002. (Cité en pages 50 et 143.)
- [Wang 2004] Z. Wang, A.C. Bovik, H.R. Sheikh et E.P. Simoncelli. *Image quality assessment : From error visibility to structural similarity.* IEEE Transactions on Image Processing, vol. 13, no. 4, pages 600–612, 2004. (Cité en page 147.)
- [Wiener 1964] N. Wiener. Extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series. MIT Press, Cambridge, 1964. (Cité en page 44.)
- [Xu 2009] Z. Xu et E.Y. Lam. *Maximum a posteriori blind image deconvolution with Huber–Markov random-field regularization.* Optics letters, vol. 34, no. 9, pages 1453–1455, 2009. (Cité en page 91.)
- [Youla 1982] D.C. Youla et H. Webb. *Image Restoration by the Method of Convex Projections : Part I Theory.* Medical Imaging, IEEE Transactions on, vol. 1, no. 2, pages 81–94, 1982. (Cité en pages 47 et 91.)
- [Yuan 2011] S. Yuan et C. Preza. *3D fluorescence microscopy imaging accounting for depth-varying point-spread functions predicted by a strata interpolation method and a principal component analysis method.* In International society for optics and photonics (SPIE), volume 19, pages 23298–23314, 2011. (Cité en pages 55 et 63.)
- [Zanella 2009] R. Zanella, P. Boccacci, L. Zanni et M. Bertero. *Efficient gradient projection methods for edge-preserving removal of Poisson noise.* Inverse Problems, vol. 25, no. 4, page 045010, 2009. (Cité en pages 49, 52, 68, 71 et 143.)
- [Zhang 2007] B. Zhang, J. Zerubia et J.C. Olivo-Marin. *Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models.* Applied Optics, vol. 46, no. 10, pages 1819–1829, 2007. (Cité en pages 32 et 33.)
- [Zhu 2010] X. Zhu et P. Milanfar. *Automatic parameter selection for denoising algorithms using a no-reference measure of image content.* Image Processing, IEEE Transactions on, vol. 19, no. 12, pages 3116–3132, 2010. (Cité en pages 52, 107, 147 et 148.)
- [Zitova 2003] B. Zitova et J. Flusser. *Image registration methods : a survey.* Image and vision computing, vol. 21, no. 11, pages 977–1000, 2003. (Cité en page 140.)